

ANDRÉIA AKEMI SUZUKAWA

PAPEL DA FEOMELANINA NA FORMAÇÃO DE LESÕES OXIDATIVAS PELO  
OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE EM DNA E EM CÉLULAS DE MELANOMA  
HUMANO

Tese apresentada ao Curso de Pós Graduação em  
Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências -  
Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Regina Martinez  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila M. B. Winnischofer

CURITIBA

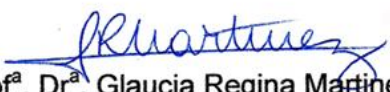
2012


## TERMO DE APROVAÇÃO


ANDRÉIA AKEMI SUZUKAWA


### PAPEL DA FEOMELANINA NA FORMAÇÃO DE LESÕES OXIDATIVAS PELO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE EM DNA E EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:   
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Glaucia Regina Martinez  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof. Dr. Carlos Renato Machado  
Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Guilhermina Rodrigues Noletto  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lia Sumie Nakao  
Departamento de Patologia Básica, UFPR

  
Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Nadja Cristhina de Souza Pinto  
Departamento de Bioquímica, IQ / USP

Curitiba, 31 de julho de 2012.

*Ao meu amado esposo, Fernando.*  
*Aos meus queridos pais, Ken-Iti e Marina.*  
*À minha irmã-madrinha, Marcinha.*  
*Por todo o amor e por todo apoio...*  
*Essa conquista é nossa!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, luz, bênção e proteção.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaucia Regina Martinez, pela orientação, incentivo e confiança durante esses 4 anos de trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sheila Maria Winnischofer, pela co-orientação, conversas e pelas ideias.

Ao meu marido Fernando, que fez esse caminho ser mais brando e por me apoiar sempre. Por toda paciência e compreensão nas noites e fim de semana de trabalho. E também por me ajudar em experimentos.

Aos meus pais, Ken-Iti e Marina, por me apoiarem desde pequena. Por terem se sacrificado para que eu tivesse uma boa educação e por todo amor e confiança em mim depositados. Amo vocês!

À minha irmã, Marcinha, pelo carinho, risadas e por me mostrar que a vida pode ser mais alegre.

Aos meus avós, Hisako (*in memoriam*), Kirico e Tomossuke, e ao meu tio, Hisahal, por todo amor e apoio. Obrigada por acreditar em mim!

À Beth, por ter dividido comigo as emoções do doutorado e também a orientadora. Pelo incentivo e por sempre me alertar sobre minha “baixa autoestima”.

Ao Thiago Jacomasso e Hudson G. Amstalden, pela amizade e pela ajuda com os experimentos.

Aos amigos Alex Evangelista, Amanda Andrade, Carolina Lane, Geison Cambri, Juliana Cibi Amorim e Lúcia Vriesmann por toda a ajuda e por terem tornado minha caminhada mais fácil e divertida.

Às Prof<sup>as</sup>. Guilhermina Noletto, Maria Eliane Merlin, Sílvia Cadena e Eva Gunilla Skare Carnieri pela ajuda e apoio durante esses 4 anos.

Aos Professores Paolo Di Mascio (IQ/USP), Ana Maria da Costa Ferreira (IQ/USP), Evaldo Ribeiro (Física – UFPR), Daniela de Luna Martins (UFF), Maurício S. Baptista (IQ/USP) e Jean-Luc Ravanat (França) pela colaboração neste trabalho.

À Aleksandra Scalfo e Marilene Silva Oliveira pela síntese do DHPN e do DADB, respectivamente.

À Cromatek, pela generosa doação dos LEDs.

Aos demais colegas do Laboratório de Oxidações Biológicas e do Departamento de Bioquímica da UFPR.

Aos Profs. Rubens Cecchini e Bernardo Mantovani, pela orientação na iniciação científica e mestrado, respectivamente, que foram os caminhos que trilhei para chegar até aqui.

Às minhas queridas amigas, Natália e Angelica, parceiras desde 2002.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica - UFPR.

Aos funcionários do Depto de Bioquímica, especialmente à Franciane, dona Marilza, Irene e à dona Ivone.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

Ao INCT de Processos Redox em Biomedicina - Redoxoma e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

*“Gravity explains the motions of the planets, but it cannot explain who sets the planets in motion.”*

*Isaac Newton*

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar o papel da feomelanina no dano induzido pelo oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) em DNA e em células de melanoma humano. Este estudo se justifica pela conhecida formação de  $^1\text{O}_2$  quando células são expostas à radiação UVA, um importante fator para o desenvolvimento do melanoma. Além disso, a feomelanina está presente em indivíduos de pele clara, o principal grupo acometido por esta neoplasia. Utilizando um modelo de DNA plasmidial, foi observado que a feomelanina e a eumelanina são capazes de levar à quebra da fita do DNA, por um mecanismo dependente de metais e que envolve a formação do radical hidroxila. Entretanto, melaninas pré-oxidadas pelo  $^1\text{O}_2$  possuem capacidade reduzida de gerar quebras na fita do DNA, possivelmente devido às mudanças estruturais que as mesmas sofrem após reagir com o  $^1\text{O}_2$ , como evidenciado pela alteração no espectro de absorção (400-600 nm) das melaninas e pelo consumo do precursor de eumelanina, o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico, após tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Além disso, foi mostrado que as melaninas podem liberar ferro da ferritina e se ligar ao DNA, o que dificulta o reconhecimento de lesões no DNA por enzimas de reparo, propriedades que podem contribuir para a perpetuação dos danos. Utilizando um modelo de cultura de células, foi avaliada a produção de feomelanina em diferentes linhagens de melanoma humano e verificado que somente a linhagem WM35 era produtora do pigmento, enquanto que as linhagens WM9 e 1205Lu não o produziam. Além do conteúdo de feomelanina, observou-se a presença de maiores níveis de glutathiona total na linhagem WM35 em relação às demais, o que concorda com sua maior expressão gênica de  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase. A presença de feomelanina não teve efeito sobre a viabilidade celular após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . O tratamento com o  $^1\text{O}_2$  não alterou imediatamente os níveis celulares de glutathiona, mas, após 18 h, observou-se um aumento dos mesmos em todas as linhagens, o que não foi acompanhado por alterações em nível de expressão das enzimas glutathiona redutase, glutathiona peroxidase ou  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase. Adicionalmente, avaliou-se os níveis de expressão gênica da SOD 1 e 2, catalase e peroxirredoxina 1. Observou-se que os níveis basais de SOD 1 e catalase eram maiores na linhagem WM35 em relação às demais, contudo, não se observou modulação de expressão após tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Através do ensaio cometa, verificou-se que os níveis basais de danos ao DNA eram equivalentes entre as linhagens. O tratamento com o  $^1\text{O}_2$  resultou em pouco DNA fragmentado e em formação significativa de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina. Dezoito horas após o tratamento, ocorreu reparo do DNA oxidado sem indução da expressão de hOGG1; este perfil foi similar para todas as linhagens analisadas. O tratamento com o  $^1\text{O}_2$  não resultou em parada de ciclo celular nas linhagens WM9 e 1205Lu. Houve parada em G<sub>1</sub> na linhagem WM35, sem, contudo, haver modulação da expressão gênica de p14/ARF, p16, p21 ou p53. Em nível celular, a presença de feomelanina pode estar relacionada à maior expressão de enzimas antioxidantes; mas pouca diferença foi observada entre as linhagens produtoras ou não de feomelanina, quando foram desafiadas pelo tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Em conjunto, conclui-se que as melaninas exercem um efeito protetor devido à sua capacidade *scavenger* de  $^1\text{O}_2$ . Por outro lado, são oxidantes frente ao DNA e, possivelmente, frente a outras biomoléculas, uma vez que células produtoras deste pigmento apresentam níveis maiores de expressão de enzimas antioxidantes.

**Palavras-chave:** Feomelanina. Oxigênio singlete. Danos ao DNA. Melanoma. Expressão de enzimas antioxidantes. Ciclo celular. Ensaio cometa. Glutathiona.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the role of pheomelanin in singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ )-induced damage to DNA and in human melanoma cells. This is relevant since  $^1\text{O}_2$  is known to be produced when cells are exposed to UVA, a causal factor in melanoma development. Furthermore, pheomelanin is predominant in fair-skinned individuals, the group that is more susceptible to this neoplasia. Using a plasmidial model, we found that pheomelanin and eumelanin led to DNA oxidation and strand breakage, by a metal- and hydroxyl radical-dependent mechanism. However,  $^1\text{O}_2$ -oxidized melanins were less effective in breaking DNA, possibly because of structural changes after  $^1\text{O}_2$  reaction, as evidenced by the alterations in the melanins' absorbance spectrum (400-600 nm) and by the consumption of the melanins' precursor, the 5,6-dihydroxy-2-indole carboxylic acid, after  $^1\text{O}_2$  treatment. Additionally, melanins were found to release iron from ferritin and bind to DNA, which result in impaired access of repair enzymes to lesions; these properties can lead to damage perpetuation. In human melanoma cells, the evaluation of pheomelanin production showed that only WM35 produced this pigment while WM9 and 1205Lu do not; however, this characteristic did not alter cell's susceptibility towards  $^1\text{O}_2$ . Besides pheomelanin content, higher basal levels of total glutathione were found in WM35 cell line, when compared to others, likely due to the higher  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase expression levels in these cells. Singlet oxygen treatment did not alter the glutathione levels immediately, but there was an increase of cellular glutathione content after 18 h, which was not accompanied by modifications on glutathione reductase, glutathione peroxidase nor  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase gene expression. Additionally, the expression of antioxidant enzymes (SOD 1 and 2, catalase and peroxyredoxin 1) was also evaluated and it was found that basal expression levels of SOD 1 and catalase were higher in WM35 cells, when compared to the others. No alterations in these enzymes were found 18 h after  $^1\text{O}_2$  treatment. By using the comet assay, we observed that the basal levels of DNA damage were similar between the cell lines. The  $^1\text{O}_2$ -treatment led to mild strand breakage but high 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine levels. Eighteen hours after, almost all the lesions were repaired with no changes in hOGG1 expression levels; this profile was similar for all cell lines. Cell cycle analyses 18 h after  $^1\text{O}_2$  treatment revealed no changes in WM9 and 1205Lu, but an accumulation of WM35 cells in G<sub>1</sub> phase. However, no gene modulation of p14/ARF, p16, p21 or p53 was found in these cells. At normal cellular levels, the presence of pheomelanin can be related to a higher expression of antioxidant enzymes, but no significant alterations were observed among cell lines that produce or not pheomelanin when challenged by  $^1\text{O}_2$ . Altogether, we conclude that melanins may have a protective effect because of their ability of scavenging  $^1\text{O}_2$ . On the other hand, they are oxidants towards DNA and possibly other biomolecules, once cells that produce this pigment have higher expression of antioxidant enzymes.

**Keywords:** Pheomelanin. Singlet oxygen. DNA damage. Melanoma. Antioxidant enzymes expression. Cell cycle. Comet assay. Glutathione.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FIGURA ESQUEMÁTICA DA PENETRAÇÃO DA RADIAÇÃO UVA E UVB NAS CAMADAS DA PELE.....	26
FIGURA 2: FASES DA EVOLUÇÃO DO MELANOMA. ....	29
FIGURA 3: COMPARAÇÃO DE IMAGENS DE LESÕES DE MELANOMA E DE NEVO BENIGNO.....	30
FIGURA 4: ESQUEMA DA ARQUITETURA DA PELE CLARA E ESCURA. ....	33
FIGURA 5: ESTRUTURA MOLECULAR DA FEOMELANINA E EUMELANINA.....	34
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS RESPONSÁVEIS PELAS PROPRIEDADES DAS MELANINAS. ....	35
FIGURA 7: VIAS DE BIOSÍNTESE DAS MELANINAS.....	37
FIGURA 8: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE ALGUNS DOS PASSOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ESTIMULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELANINA PELA RADIAÇÃO UV. ....	39
FIGURA 9: AGONISMO E ANTAGONISMO DOS RECEPTORES DE MELANOCORTINA.....	41
FIGURA 10: DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA DO OXIGÊNIO MOLECULAR NOS ESTADOS FUNDAMENTAL E SINGLETE. ....	45
FIGURA 11: ESQUEMA DO PROCESSO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO.....	48
FIGURA 12: SÍNTESE DO ENDOPERÓXIDO A PARTIR DO DERIVADO DE NAFTALENO, DMN, E SUA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA. ....	50
FIGURA 13: ESTRUTURA DA GUANINA E DE ALGUMAS LESÕES DERIVADAS DA GUANINA.....	65
FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO DA VIA DE REPARO POR BER. ....	69
FIGURA 15: PAREAMENTOS POSSÍVEIS ENTRE AS BASES E MECANISMOS DE REPARO DA LESÃO 8-OXOdGUO. ....	71

FIGURA 16: ESTRUTURAS DA 4-AMINO-4-HIDROXIFENILALANINA (AHP) E DA 3-AMINOTIROSIDA (AT), PRODUTOS DA HIDRÓLISE IODÍDRICA DA FEOMELANINA.....	78
FIGURA 17: ESTRUTURAS DO DHPN E DHPNO <sub>2</sub> .....	80
FIGURA 18: FORMAS TOPOLÓGICAS DE UM PLASMÍDEO E DIFERENÇAS NA SUA CORRIDA ELETROFORÉTICA. ....	81
FIGURA 19: CARACTERÍSTICAS DOS LEDS UTILIZADOS NESTE TRABALHO. ....	83
FIGURA 20: APARATO CONSTRUÍDO PARA IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS. ....	91
FIGURA 21: POTÊNCIA LUMINOSA (EM mW/cm <sup>2</sup> ) EMITIDA NA SUPERFÍCIE INTERNA DA CÂMARA CONSTRUÍDA PARA A IRRADIAÇÃO CELULAR. ....	92
FIGURA 22: INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA QUEBRA DO DNA PELAS MELANINAS.....	106
FIGURA 23: QUANTIFICAÇÃO DOS NUCLEOSÍDEOS OXIDADOS APÓS INCUBAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pUC18 COM AS MELANINAS OU DHPNO <sub>2</sub> ....	107
FIGURA 24: ESPECTRO DE EPR DA FEOMELANINA. ....	109
FIGURA 25: CINÉTICA DE INDUÇÃO DA QUEBRA DO DNA.....	110
FIGURA 26: EFEITO DAS MELANINAS SOBRE A LIBERAÇÃO DO FERRO DA FERRITINA AO LONGO DO TEMPO. ....	111
FIGURA 27: EFEITO DO <sup>1</sup> O <sub>2</sub> NA QUEBRA DE DNA INDUZIDA PELAS MELANINAS.....	113
FIGURA 28: EVIDÊNCIAS DA REAÇÃO DO <sup>1</sup> O <sub>2</sub> COM AS MELANINAS.....	115
FIGURA 29: DANO AO DNA APÓS INCUBAÇÃO COM DHPNO <sub>2</sub> E/OU MELANINAS E O RECONHECIMENTO DE BASES OXIDADAS POR ENZIMAS DE REPARO DE DNA.....	117
FIGURA 30: COMPETIÇÃO ENTRE AS MELANINAS E O HOECHST 33342 PELO SULCO MENOR DO DNA.....	119

FIGURA 31: DIMINUIÇÃO DO POTENCIAL DE RECONHECIMENTO DE LESÕES NO DNA PELA ENZIMA FPG NA PRESENÇA DAS MELANINAS.....	121
FIGURA 32: VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO DE AT. ....	123
FIGURA 33: QUANTIFICAÇÃO DA FEOMELANINA INTRACELULAR APÓS TRATAMENTOS PARA INDUÇÃO DA FEOMELANOGENESE.....	126
FIGURA 34: VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE MELANOMA PARA INDUÇÃO DE FEOMELANOGENESE. ....	127
FIGURA 35: COMPARAÇÃO VISUAL E QUANTITATIVA DOS NÍVEIS TOTAIS DE MELANINA DAS LINHAGENS WM9, WM35 E 1205Lu. ....	129
FIGURA 36: QUANTIFICAÇÃO DA FEOMELANINA CELULAR ATRAVÉS DA DOSAGEM DE AHP.....	129
FIGURA 37: INTERNALIZAÇÃO E DESACETILAÇÃO DO RBAc PELAS CÉLULAS. ....	131
FIGURA 38: VIABILIDADE CELULAR IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA IRRADIAÇÃO.....	133
FIGURA 39: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DAS 3 LINHAGENS IMEDIATAMENTE APÓS A EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO. ....	134
FIGURA 40: VIABILIDADE CELULAR 18 h APÓS O TÉRMINO DA IRRADIAÇÃO. ....	136
FIGURA 41: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DAS 3 LINHAGENS 18 h APÓS A EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO.....	138
FIGURA 42: MEDIDA DA PRODUÇÃO DE $^1\text{O}_2$ POR FOTOSSENSIBILIZAÇÃO, PELA UTILIZAÇÃO DO FFA.....	141
FIGURA 43: COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS DE GLUTATIONA TOTAL E DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA $\gamma$ -GLUTAMILCISTEÍNA LIGASE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO. ....	142

FIGURA 44: NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL (GSx) IMEDIATAMENTE APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM $^1\text{O}_2$ .	145
FIGURA 45: NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL (GSx) 18 h APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM $^1\text{O}_2$ .	147
FIGURA 46: ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DA ENZIMA $\gamma$ -GLUTAMILCISTEÍNA LIGASE, 18 h APÓS O TRATAMENTO COM O $^1\text{O}_2$ .	149
FIGURA 47: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .	152
FIGURA 48: COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS BASAIS DE DANOS AO DNA ENTRE AS LINHAGENS WM9, WM35 E 1205Lu.	155
FIGURA 49: NÍVEIS DE DANOS AO DNA NAS 3 LINHAGENS, 0 E 18 h APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ , AVALIADOS PELO ENSAIO COMETA.	157
FIGURA 50: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA hOGG1 APÓS O TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .	159
FIGURA 51: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DO CICLO CELULAR.	160
FIGURA 52: ANÁLISE DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO APÓS 18 h DA EXPOSIÇÃO AO $^1\text{O}_2$ .	162
FIGURA 53: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CICLO CELULAR, APÓS 18 h DO TRATAMENTO COM $^1\text{O}_2$ .	165

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: EROS BIOLOGICAMENTE RELEVANTES.....	43
TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DOS ESTADOS FUNDAMENTAL E ATIVADO DO OXIGÊNIO MOLECULAR. ....	46
TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS FOTOSSENSIBILIZADORES COMUMENTE UTILIZADOS.....	48
TABELA 4: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E ALTERAÇÃO EM VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL PELO $^1\text{O}_2$ GERADO FOTOQUIMICAMENTE.....	57
TABELA 5: POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DE DNA. ....	64
TABELA 6: TAXA DE DESATIVAÇÃO TOTAL DO $^1\text{O}_2$ PELOS DERIVADOS DE NUCLEOSÍDEOS.....	64
TABELA 7: DADOS REFERENTES ÀS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NESTE TRABALHO. ....	85
TABELA 8: CONCENTRAÇÃO E SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA TÉCNICA DO RT-qPCR.....	99
TABELA 9: RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS, JÁ DESCRITAS NA LITERATURA, ONDE HOVE AUMENTO DA FEOMELANOGENESE.....	125

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**<sup>1</sup>PTS\*** - fotossensibilizador no excitado singlete

**<sup>3</sup>PTS\*** - fotossensibilizador no estado triplete

**8-oxodGuo** - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina

**ACTH** - hormônio adrenocorticotrópico

**ADP** – adenosina difosfato

**AHP** - 4-amino-3-hidroxifenilalanina

**AMPc** – adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

**ASP** – proteína sinalizadora *agouti*

**AT** - 3-amino-4-hidroxifenilalanina (3-aminotirosina)

**ATP** – adenosina trifosfato

**BER** – Reparo por Excisão de Base

**CA** – forma circular aberta do plasmídeo

**D<sub>2</sub>O** - água deuterada

**DHI** - dihidroxi-indol

**DHICA** - ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico

**DHPN** - *N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftaleno dipropanamida

**DHPNO<sub>2</sub>** – endoperóxido do DHPN

**DMN** - 1,4-dimetilnaftaleno

**DMSO** - dimetilsulfóxido

**DQ** - dopaquinona

**EDTA** - ácido etilenodiaminotetraacético

**EndoIII** - endonuclease III

**EPR** - ressonância paramagnética eletrônica

**EROS** - espécies reativas de oxigênio

**FPG** - formamidopirimidina–DNA glicosilase

**GPx** – glutathione peroxidase

**GRed** – glutathione reductase

**GSH** - glutathione reduzida

**GSSG** - glutathione oxidada

**GTP** - Guanosina trifosfato

**HBSS** - solução balanceada de Hanks

**HMBS** - hidroximetilbilano sintase

**HPRT** - hipoxantina fosforibosiltransferase

**hOGG1** - 8-hidroxi guanina DNA-glicosilase humana

**HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência

**IDN** - índice de danos ao DNA

**L** – forma linear do plasmídeo

**LEDs** - diodos emissores de luz (*light-emitting diodes*)

**MB** - azul de metileno

**MC1R** – receptor de melanocortina 1

**MDA** - malondialdeído

**MITF** - fator de transcrição da microftalmia

**MS** – espectrometria de massas

**MTT** - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazil-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

**NADP<sup>+</sup>** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**NDPO<sub>2</sub>** - endoperóxido do 3,3'-(1,4-naftilideno) dipropionato

**NER** - Reparo por Excisão de Nucleotídeo

**NF-κB** - fator nuclear *kappa* B

**PBS** - solução salina fosfato tamponada

**PCR** – reação em cadeia da polimerase

**PDT** - Terapia Fotodinâmica

**Pi** – fosfato inorgânico

**POMC** - pró-opiomelanocortina

**Prdx** - peroxiredoxina

**PTS** - molécula fotossensibilizadora (fotossensibilizador)

**RBAC** - Rosa Bengala Acetato

**RT-qPCR** - PCR quantitativo em tempo real

**SDS** – dodecil sulfato de sódio

**SE** – forma superenovelada do plasmídeo

**SFB** - soro fetal bovino

**sítios AP** – sítios abásicos

**SOD** - superóxido dismutase

**TBARS** - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**ThdGly** - 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina (timidina glicol)

**TNF-α** - Fator de necrose tumoral α

**TYR** - tirosinase

**Tyrp1** - proteína 1 relacionada à tirosinase

**Tyrp2** - proteína 2 relacionada à tirosinase

**UV**- radiação ultravioleta

**UVA** - radiação ultravioleta A

**$\alpha$ -MSH** - hormônio estimulador dos melanócitos  $\alpha$



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Melanoma .....	25
2.1.1 Principais fatores de risco associados ao melanoma .....	25
2.1.2 Fases do desenvolvimento do melanoma e diagnóstico .....	28
2.1.3 Tratamento .....	30
2.2 Melaninas.....	32
2.2.1 Biossíntese das melaninas .....	35
2.2.2 Regulação da melanogênese .....	39
2.3 Espécies reativas de oxigênio (EROS) .....	42
2.3.1 EROS biologicamente importantes.....	42
2.3.2 Oxigênio Molecular Singlete .....	44
2.3.3 Fontes de Oxigênio Molecular Singlete .....	46
2.3.4 Efeitos Biológicos do Oxigênio Molecular Singlete .....	50
2.4 Sistema antioxidante celular .....	51
2.4.1 Defesa contra a ação do Oxigênio Molecular Singlete .....	54
2.5 Estado redox em melanomas.....	58
2.5.1 Efeitos das melaninas no estado redox celular.....	59
2.6 Danos ao DNA .....	62
2.6.1 Danos ao DNA pelo $^1\text{O}_2$ .....	63
2.6.2 Reparo das lesões oxidativas no DNA .....	66
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	74

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	77
4.1 Reagentes.....	77
4.2 Síntese da feomelanina.....	77
4.3 Confirmação da síntese da feomelanina .....	78
4.4 Síntese do derivado de naftaleno <i>N,N'</i> -di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftalenodipropanamido - DHPN .....	79
4.5 Síntese do endoperóxido – DHPNO <sub>2</sub> . ....	79
4.6 Síntese do DHICA.....	80
4.7 Ensaio de quebras de fita de DNA .....	80
4.8 Dosagem de bases de DNA oxidadas.....	82
4.9 Análise da feomelanina por EPR .....	82
4.10 Ensaio de liberação do ferro da ferritina .....	83
4.11 Fotossensibilização das melaninas.....	83
4.12 Espectro das melaninas após reação com DHPNO <sub>2</sub> .....	84
4.13 Reação do DHICA com o DHPNO <sub>2</sub> e análise por HPLC e espectrometria de massas .....	84
4.14 Ensaio de deslocamento do Hoechst 33342.....	84
4.15 Cultivo de células de melanoma humano SK-Mel 23, WM9, WM35 e 1205Lu .....	85
4.16 Soluções utilizadas para o cultivo celular.....	86
4.16.1 Meios de cultivo.....	86
4.16.2 Solução Salina Fosfato - Tamponada (PBS).....	86
4.16.3 Solução Balanceada de Hanks (HBSS) .....	86
4.16.4 Solução de tripsina-EDTA .....	87

4.17	Estímulo da feomelanogênese em células da linhagem SK-Mel23 .....	87
4.18	Plaqueamento das células WM9, WM35 e 1205Lu para dosagem de feomelanina .....	87
4.19	Hidrólise iodídrica para dosagem de feomelanina celular .....	88
4.20	Dosagem da feomelanina por HPLC .....	88
4.21	Dosagem de melanina total .....	89
4.22	Ensaio de viabilidade celular após o tratamento para o estímulo da feomelanogênese .....	89
4.23	Síntese do Fotossensibilizador Rosa Bengala Acetato (RBAC) .....	90
4.24	Câmara de irradiação das células para fotossensibilização.....	90
4.25	Internalização do RBAC pelas células.....	92
4.26	Medida da geração de $^1\text{O}_2$ .....	93
4.27	Viabilidade celular após irradiação .....	93
4.27.1	Método do MTT .....	93
4.27.2	Método do Cristal Violeta .....	94
4.28	Avaliação do Ciclo Celular .....	95
4.29	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real .....	96
4.29.1	Extração do mRNA.....	97
4.29.2	Síntese do DNA complementar (cDNA) .....	97
4.29.3	RT-qPCR.....	98
4.30	Quantificação de glutathiona total celular (GSx) .....	100
4.31	Dosagem de proteínas.....	100
4.32	Ensaio Cometa .....	101
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104

5.1	POTENCIAL DAS MELANINAS E DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE DE PROMOVER O DANO AO DNA .....	104
5.1.1	Mecanismo pelo qual as melaninas induzem a quebra de fitas de DNA .....	104
5.1.2	Propagando o dano: liberação de ferro da ferritina.....	110
5.1.3	Ação do $^1\text{O}_2$ sobre o dano oxidativo ao DNA causado pelas melaninas .....	111
5.1.4	Reconhecimento de lesões no DNA causadas pelas melaninas por enzimas de reparo .....	116
5.2	EFEITO DO CONTEÚDO DE FEOMELANINA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO E SUA RESPOSTA FRENTE AO TRATAMENTO COM O OXIGÊNIO SINGLETE .....	122
5.2.1	Otimização dos parâmetros para dosagem de feomelanina intracelular por HPLC .....	122
5.2.2	Modulação da síntese de feomelanina em células de melanoma da linhagem SK-Mel23.....	124
5.2.3	Avaliação dos níveis de feomelanina celular nas linhagens WM9, WM35 e 1205Lu. ....	128
5.2.4	Internalização celular do fotossensibilizador Rosa Bengala Acetato (RBAC) .....	130
5.2.5	Viabilidade celular após a irradiação na presença de RBAC .....	131
5.2.6	Avaliação dos níveis de $^1\text{O}_2$ formados pela irradiação com o Rosa Bengala.....	139
5.2.7	Dosagem de glutathiona.....	142
5.2.8	Análise da expressão gênica de enzimas antioxidantes.....	149
5.2.9	Avaliação dos danos ao DNA pelo ensaio cometa e habilidade de reparo do DNA.....	154

5.2.10	Avaliação do ciclo celular .....	159
6.	DISCUSSÃO FINAL .....	166
7.	CONCLUSÕES .....	170
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	172
9.	OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO .....	193
10.	ANEXOS .....	194

## 1. INTRODUÇÃO

O melanoma maligno é uma neoplasia que, apesar de pouco incidente, é altamente letal (Mendes, Koifman *et al.*, 2010). Dentre os fatores de risco associados ao melanoma, encontram-se a exposição à radiação ultravioleta (Garibyan e Fisher, 2010) e o fenótipo caucasiano (Berwick, Erdei *et al.*, 2009). É sabido que a radiação ultravioleta A (UVA) pode levar à geração de oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) em sistemas biológicos (Baier, Maisch *et al.*, 2007) e, de forma interessante, esta mesma espécie tem sido explorada como alternativa para o tratamento do melanoma, através da terapia fotodinâmica (Davids e Kleemann, 2010). O interesse no uso da terapia fotodinâmica em melanomas se deve às várias vantagens que este método proporciona, como, por exemplo, o bom resultado estético e a baixa toxicidade sistêmica (Davids e Kleemann, 2010). O insucesso da utilização desta terapia em melanomas é atribuído à presença de melanina, uma vez que estes polímeros podem absorver luz (Wang, Marino *et al.*, 2008) e atuar como *scavengers* de espécies reativas de oxigênio (Rozanowska, Sarna *et al.*, 1999), inclusive de  $^1\text{O}_2$  (Tada, Kohno *et al.*, 2010).

O fenótipo caucasiano caracteriza-se por uma alta relação entre feomelanina e eumelanina na epiderme. A feomelanina é um polímero de coloração entre amarelo e vermelho e vêm sendo descritas propriedades deletérias a seu respeito, como, por exemplo, sua ação fotossensibilizadora (Krol e Liebler, 1998) e sua capacidade de amplificar a formação de danos ao DNA, quando melanócitos são expostos à radiação UVA (Wenczl, Van Der Schans *et al.*, 1998). Por outro lado, o estímulo da (eu)melanogênese em melanócitos humanos conferiu proteção de seu DNA contra a ação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hoogduijn, Cemeli *et al.*, 2004). Embora a interação entre DNA e melaninas em melanócitos não seja favorecida devido à compartimentalização da síntese deste pigmento, é sabido que, durante a malignização destas células, ocorre perda estrutural dos melanossomos (Rhodes, Seki *et al.*, 1988), o que pode favorecer a interação das melaninas com outras estruturas celulares, como o DNA. As consequências decorrentes desta interação anômala permaneciam desconhecidas; dessa forma, um dos objetivos deste estudo

foi compreender o mecanismo e as implicações desta interação, utilizando plasmídeos como modelo de DNA.

Devido à importância do  $^1\text{O}_2$  na etiologia e no tratamento do melanoma, também foi investigado como o  $^1\text{O}_2$  poderia interferir nas reações entre o DNA e as melaninas.

Além do DNA, outras estruturas celulares podem ser alvo da ação da melanina, especialmente aquelas relacionadas aos processos redox. É relatada a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) durante a melanogênese (Komarov, Slepneva *et al.*, 2005; Cunha, Kawahara *et al.*, 2012); em particular, a feomelanogênese está relacionada com a defesa antioxidante celular por ser influenciada pelos níveis de glutathione presentes na célula (Imokawa, 1989; Benathan, 1996). A maior produção de EROS em células sintetizadoras de (fe)melanina poderia resultar em um estado redox celular diferenciado, em relação às células não produtoras deste pigmento. Desta forma, outro objetivo deste trabalho foi avaliar as diferenças do sistema redox entre células de melanoma humano produtoras ou não produtoras de feomelanina, enfocando a síntese de glutathione, a expressão de enzimas antioxidantes e os danos oxidativos ao DNA.

Por último, também se investigou a resposta de células de melanoma humano, distintas quanto ao conteúdo de feomelanina, frente ao tratamento com o  $^1\text{O}_2$  gerado através de fotossensibilização. A relevância da compreensão dos mecanismos subsequentes a esta interação é fortalecida por dados recentes, onde foi mostrado que a presença das melaninas é um fator importante na geração do melanoma mediada pela radiação UVA (Noonan, Zaidi *et al.*, 2012). Uma das principais consequências causadas pela radiação UVA /  $^1\text{O}_2$  em sistemas celulares é o dano ao DNA, uma vez que esta espécie é capaz de oxidar o DNA, gerando produtos que favorecem a mutagênese (Devasagayam, Steenken *et al.*, 1991; Boiteux, Gajewski *et al.*, 1992). Além disso, é sugerida a participação da glutathione (Otsu, Sato *et al.*, 2005) e de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase, na proteção contra a ação do  $^1\text{O}_2$  (Kim, Kim *et al.*, 2002; Fischer, Krieger-Liszkay *et al.*, 2004; Fischer, Eggen *et al.*, 2006), mas a modulação gênica destas enzimas em eucariotos, através de uma possível resposta adaptativa, havia sido pobremente explorada. Sendo assim, os efeitos do  $^1\text{O}_2$  sobre células produtoras ou

não de feomelanina foram avaliados imediatamente ou 18 h após o desafio pelo  $^1\text{O}_2$ , a fim de observar possíveis respostas adaptativas destas células a este agente agressor, além de contribuir para o entendimento do papel da feomelanina neste sistema. Mais especificamente, foram avaliados a viabilidade celular, o conteúdo de glutathiona total, a expressão de enzimas antioxidantes, os danos oxidativos ao DNA e a progressão do ciclo celular.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MELANOMA

O melanoma maligno é uma neoplasia derivada dos melanócitos. Os melanócitos, por sua vez, são células originadas a partir das células-tronco da crista neural (Sommer, 2011), sendo encontrados na pele, cabelos, olhos e cérebro (Hearing e Leong, 2006). Possuem organelas semelhantes aos lisossomos, os melanossomos, onde ocorre a síntese do pigmento melanina.

Embora o melanoma seja o tipo menos prevalente de câncer de pele (representa menos de 5 % dos casos), é responsável por cerca de 80 % do total de mortes por este tipo de tumor e 1 % do total de mortes por câncer no Brasil (Mendes, Koifman *et al.*, 2010). Há previsão de que, em 2012, haverá 6.230 novos casos de melanoma no Brasil, igualmente distribuídos entre os sexos (Inca, 2012a). Destes, 1.580 casos devem surgir na região sul (Inca, 2012b), enquanto 3.530 novos casos são previstos para a região sudeste (Inca, 2012c), as regiões com maior prevalência desta neoplasia no país.

#### 2.1.1 Principais fatores de risco associados ao melanoma

Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do melanoma são divididos em duas classes:

- a. **Fatores ambientais:** o principal fator ambiental relacionado ao desenvolvimento do melanoma é a radiação ultravioleta (UV), oriunda da exposição aos raios solares. Os raios UV fazem parte de um espectro de radiação eletromagnética, sendo divididos em três regiões, listadas aqui em ordem decrescente de energia: UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) e UVA (320 – 400 nm). A radiação UVC, altamente energética, é quase totalmente filtrada pela camada de ozônio, não sendo relevante na biologia do melanoma. Por outro lado, 10 % dos raios UVB e 95 % dos raios UVA chegam à superfície da Terra. No comprimento de onda das radiações UV, os fótons são altamente energéticos e podem iniciar reações fotoquímicas em moléculas biológicas. Apesar de a radiação UVB ser mais energética, portanto, podendo causar mais danos celulares, ela apresenta baixa penetração na pele (Figura 1). Por sua vez, a radiação UVA é capaz de

penetrar nas camadas mais profundas da pele (Garibyan e Fisher, 2010), conforme ilustrado na figura 1 e tem sido particularmente apontada como um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma (Moan, Dahlback *et al.*, 1999). É importante ressaltar que tanto a dose quanto a frequência desta exposição interferem na sua correlação com o desenvolvimento do melanoma, pois há estudos que mostram que a exposição intermitente e as queimaduras solares esporádicas são mais importantes do que a exposição crônica, como a que acontece com os indivíduos que trabalham ao ar livre (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Picconi *et al.*, 2005; Ivry, Ogle *et al.*, 2006; Berwick, Erdei *et al.*, 2009; Chang, Barrett *et al.*, 2009). Outro fator que vem sendo positivamente relacionado ao risco de desenvolver o melanoma é o uso das câmaras de bronzamento artificial (onde é utilizada a radiação UVA), apontado como responsável pela alta incidência de melanoma em mulheres jovens (Coelho e Hearing, 2010).

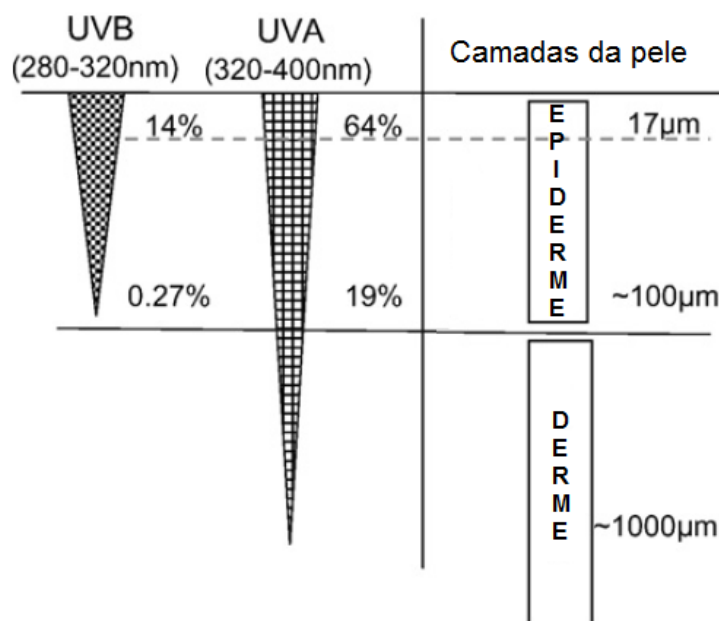


FIGURA 1: FIGURA ESQUEMÁTICA DA PENETRAÇÃO DA RADIAÇÃO UVA E UVB NAS CAMADAS DA PELE.

FONTE: adaptado de Herrling, Jung e colaboradores (2008).

NOTA: A radiação UVB, apesar de mais energética, exerce seus efeitos apenas na camada mais externa da pele, a epiderme, sendo que menos de 0,27 % da potência inicial alcança 100 µm de penetrância. A radiação UVA, por outro lado, pode atingir também a derme, gerando danos nas camadas mais profundas da pele. Esta propriedade torna a radiação UVA particularmente importante na biologia do melanoma, uma vez que os melanócitos se encontram na camada basal; camada que separa a epiderme da derme.

- b. **Fatores individuais:** Os fatores individuais parecem ser os mais relevantes para o desenvolvimento do melanoma. Dentre eles, encontram-se:
- **Número de pintas ou nevos displásicos:** embora haja discussão sobre a importância do número de lesões melanocíticas no risco do desenvolvimento do melanoma, vários estudos demonstram uma correlação positiva entre estes dois fatores (Skender-Kalnenas, English *et al.*, 1995; Massi, Carli *et al.*, 1999; Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Abeni *et al.*, 2005).
  - **Fatores genéticos:** mutações ou deleções em alguns genes têm sido relacionadas à predisposição no desenvolvimento do melanoma. Dentre os genes que frequentemente aparecem mutados ou deletados em indivíduos portadores de melanoma, estão: o gene supressor de tumor *CDKN2A* (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) e os protooncogenes *Cdk4* (quinase dependente de ciclina 4) e *B-Raf* (Gruber, Kastelan *et al.*, 2008). Variações no gene *mc1r* (receptor de melanocortina 1), responsável pela pigmentação, também são associadas ao melanoma (Miller e Mihm, 2006; Tucker, Margaret A., 2009). Além disso, polimorfismos no gene *Xpd* (que codifica para proteínas envolvidas no reparo de DNA via Reparo por Excisão de Nucleotídeo – NER), mas não de *Xpc*, *Xpg* ou *Xpf*, têm sido relacionados a um maior risco de desenvolver melanoma (Millikan, Hummer *et al.*, 2006; Kertat, Rosdahl *et al.*, 2008). De fato, indivíduos portadores de *Xeroderma pigmentosum* possuem até 1.000 vezes mais chance de desenvolver melanoma (Kraemer, Lee *et al.*, 1994).
  - **Histórico de melanoma:** Indivíduos com histórico de melanoma ou de outros tipos de câncer de pele possuem maior risco de desenvolver melanoma (Miller e Mihm, 2006; Berwick, Erdei *et al.*, 2009; Tucker, Margaret A., 2009). Além disso, o histórico familiar também parece ser importante, uma vez que cerca de 5 a 12 % dos pacientes com melanoma possuem precedente familiar desta doença (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Zanetti *et al.*, 2005; Berwick, Erdei *et al.*, 2009; Tucker, M. A., 2009).
  - **Fenótipo:** o tipo fenotípico também é apontado como relevante na epidemiologia do melanoma. Indivíduos de pele, cabelos e olhos claros, que sofrem facilmente queimaduras solares e desenvolvem sardas, são mais susceptíveis ao

desenvolvimento de melanoma do que indivíduos com a pele altamente pigmentada (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Zanetti *et al.*, 2005; Berwick, Erdei *et al.*, 2009). Os indivíduos com este fenótipo não diferem apenas na *quantidade* de melanina, mas também diferem quanto ao *tipo* de melanina prevalente em sua pele. Os indivíduos de pele clara (loiros e ruivos) possuem, predominantemente, feomelanina (de coloração amarela / vermelha) enquanto os de pele mais pigmentada apresentam maior conteúdo de eumelanina (de coloração marrom / preta). A relevância do tipo de melanina na biologia do melanoma também é suportada pelo fato de que, em melanócitos displásicos (lesão que antecede o aparecimento do melanoma), a razão entre feomelanina e eumelanina é 9 vezes maior do que na pele normal de caucasianos (Salopek, Yamada *et al.*, 1991).

#### 2.1.2 Fases do desenvolvimento do melanoma e diagnóstico

De acordo com a classificação de Clark, existem 5 fases do desenvolvimento e progressão do melanoma, até alcançar a fase metastática. Neste modelo, são enfatizadas as mudanças histopatológicas que ocorrem durante a progressão do melanoma. Inicialmente, os melanócitos, que originalmente se localizam na epiderme, próximo à membrana basal, sofrem uma alteração no controle do crescimento celular, dando origem aos nevos benignos. Nesta etapa, o crescimento é limitado e percebe-se apenas um aglomerado de melanócitos ao longo da membrana basal. Clinicamente, as lesões são planas ou um pouco elevadas, com coloração regular. O próximo passo em direção à malignidade é o crescimento aberrante, que dá origem à lesões assimétricas, com bordas irregulares e de várias cores. Essas lesões são conhecidas como nevos displásicos e são observadas ao microscópio com citologia atípica e crescimento desordenado. Em seguida, surge o melanoma de crescimento radial, onde as células malignas continuam se proliferando dentro da epiderme, já com características morfológicas neoplásicas, podendo haver penetração de algumas células isoladas na parte superior da derme, a derme papilar. Posteriormente, pode haver formação do melanoma de crescimento vertical. Neste estágio, as células são capazes de transpor a membrana basal, invadir a derme e formar nódulos expansivos na membrana reticular. Por último, há o melanoma metastático, onde há migração das células para outros órgãos,

formando focos metastáticos. O melanoma tem alta capacidade de formar metástases; daí a sua alta letalidade. Nesta fase, as células são capazes de formar metástases quando aplicados em camundongos imunossuprimidos (Miller e Mihm, 2006). Um desenho esquemático das fases do melanoma é mostrado na figura 2.

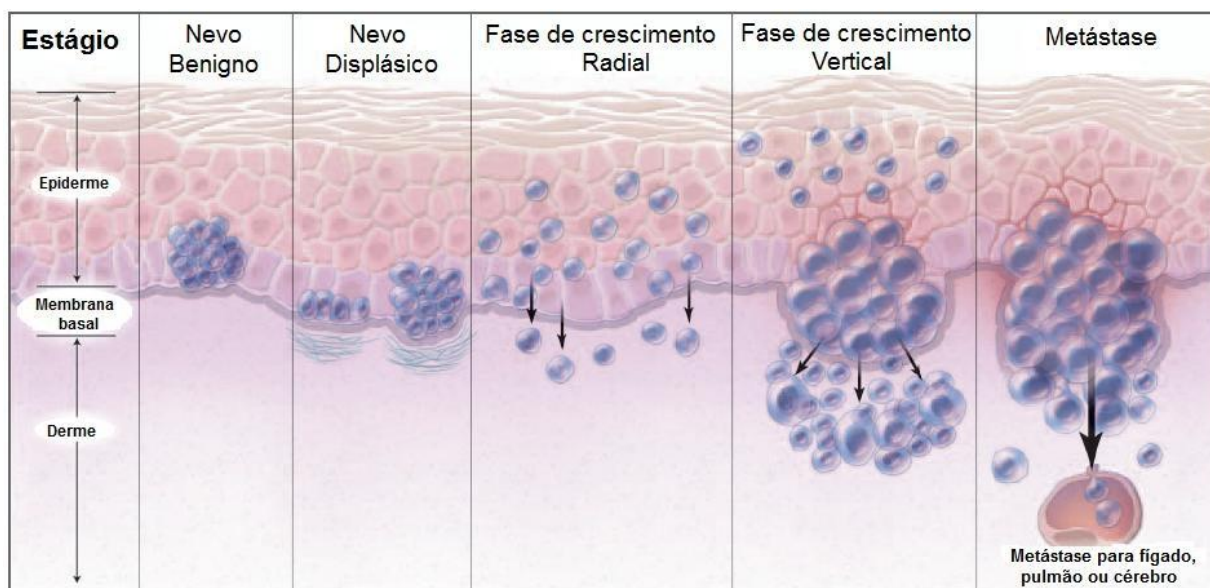


FIGURA 2: FASES DA EVOLUÇÃO DO MELANOMA.

FONTE: adaptado de Miller e Mihm (2006).

NOTA: Durante a evolução do melanócito até a fase de melanoma metastático, são encontradas 5 fases principais: nevo benigno, onde o crescimento celular é controlado; nevo displásico, quando há crescimento aberrante, mas ainda limitado; melanoma de crescimento radial, quando as células já podem transpassar a membrana basal, mas seu crescimento ainda é mais expressivo na epiderme; melanoma de crescimento vertical, onde ocorre invasão significativa da derme; e melanoma metastático, quando há invasão de outros órgãos.

Diante do que foi exposto acima, fica claro que a detecção do melanoma nos primeiros estágios de seu desenvolvimento favorece a sobrevida do paciente. Dados mostram que, quando o melanoma é diagnosticado e tratado tendo espessura de até 1 mm, o prognóstico é muito bom, sendo que cerca de 93 % dos pacientes vivem por 15 anos ou mais. Já quando o tratamento ocorre em fases mais tardias, ou seja, quando o melanoma possui 4 mm ou mais de espessura, a taxa de sobrevida cai para 42 % (Rigel, Russak *et al.*, 2010). Em melanomas metastáticos, o prognóstico é ainda pior: menos de 10 % dos pacientes diagnosticados nesta fase sobrevivem por 5 anos (Thompson, Scolyer *et al.*, 2005).

O padrão ouro para o diagnóstico do melanoma continua sendo a histopatologia, embora outras técnicas não invasivas, como a dermatoscopia, a microscopia confocal de varredura a laser e o ultrassom de alta resolução sejam também bastante úteis (Wang, Rabinovitz *et al.*, 2004; Wang e Hashemi, 2010). Na clínica, embora seja necessário um “bom olho clínico”, continua-se utilizando a regra do “ABCD” do melanoma (Assimetria, Bordas irregulares, mais de uma Cor e Díâmetro maior que 6 mm), recentemente atualizado para “ABCDE” (Evolução do melanoma, ou seja, o aumento do tamanho da lesão, foi incluído) (Wang, Rabinovitz *et al.*, 2004; Rigel, Russak *et al.*, 2010). Ressalta-se aqui que nem sempre as 5 características estão presentes, mas sempre mais de uma o está. Esta técnica é simples e permite que a população em geral possa observar a ocorrência deste tipo de neoplasia, em um autoexame. A figura 3 apresenta uma ilustração na qual são diferenciados o melanoma do nevo benigno:

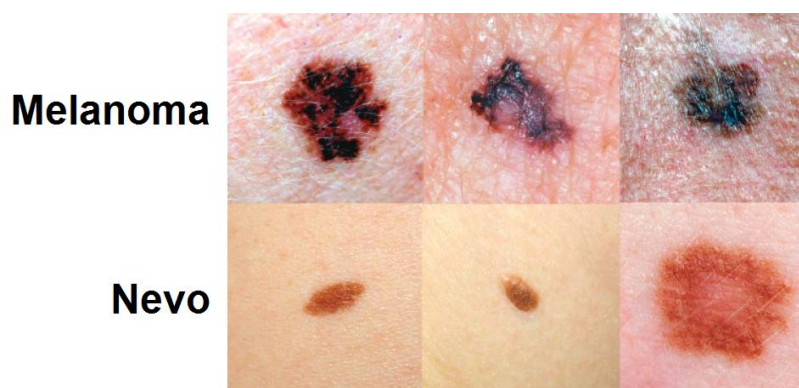


FIGURA 3: COMPARAÇÃO DE IMAGENS DE LESÕES DE MELANOMA E DE NEVO BENIGNO.

FONTE: Rigel, Russak e colaboradores (2010).

NOTA: As 3 figuras do topo ilustram o melanoma maligno, onde se pode observar algumas das características descritas no “ABCDE” do melanoma. Abaixo, para efeito de comparação, constam nevos benignos.

### 2.1.3 Tratamento

O tipo de tratamento indicado para o melanoma depende do estágio em que a doença se encontra. Nos primeiros estágios, quando o tumor ainda é localizado apenas na pele, a remoção cirúrgica é a mais adequada. Neste caso, é recomendado que o tumor seja removido com uma margem de 1 a 5 cm ao redor do mesmo, dependendo da sua espessura. Um tratamento adjuvante com interleucinas

ou interferons pode ainda ser usado. Em alguns casos, pode ser recomendada a biópsia do linfonodo sentinela, que se baseia no fato de que a drenagem linfática do tumor passa primeiramente pelo linfonodo sentinela antes de seguir para outros linfonodos. Assim, ele se torna o local mais provável de se encontrar possíveis células metastáticas. Entretanto, a indicação deste procedimento ainda é discutida (Thompson, Scolyer *et al.*, 2005; Tuong, Cheng *et al.*, 2012).

Avanços vêm sendo conquistados em prol de uma terapia alternativa para o tratamento do melanoma localizado: a terapia fotodinâmica (PDT). Esta terapia, cujos princípios serão detalhados mais tarde, se baseia no uso de um corante fotossensibilizador que, na presença de luz, produz espécies reativas de oxigênio, especialmente o  $^1\text{O}_2$ , tóxicas para o tumor. Devido ao papel fotoprotetor conferido às células pela melanina, a PDT não teve muito sucesso contra o melanoma até o momento (Wang, Marino *et al.*, 2008). Entretanto, já existe a aprovação do uso da PDT como tratamento para algumas patologias, como, por exemplo, a doença de Bowen, carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular (Babilas, Schreml *et al.*, 2010). As principais vantagens do uso da PDT em relação aos tratamentos convencionais são: a baixa toxicidade sistêmica, a seletividade para destruir o tumor, a possibilidade de ser utilizada com terapias adjuvantes e o bom resultado estético (Davids e Kleemann, 2010). Desta forma, uma segunda geração de fotossensibilizadores vem sendo testada quanto à sua eficácia frente ao melanoma. Para esta segunda geração, tem-se buscado fotossensibilizadores que sejam estáveis, acumulados preferencialmente no tecido-alvo, que apresentem mínima toxicidade na ausência de luz e máxima eficácia quando irradiados, além de maior rendimento da geração de  $^1\text{O}_2$ . Tem-se utilizado, principalmente, hidroxiquinonas cromóforas naturais, como as hipericinas e porfíricos (Davids e Kleemann, 2010).

Para o melanoma metastático, o tratamento é mais difícil, pois este tipo de tumor é resistente à radioterapia, à apoptose, é capaz de evadir do sistema imune e tem alta capacidade de angiogênese, o que contribui para sua progressão (Marquez-Rodas, Martin Algarra *et al.*, 2011). Atualmente, utilizam-se quimioterápicos como a dacarbazina, temozolomida, fotemustina, cisplatina e o paclitaxel, isoladamente ou combinados (Thompson, Scolyer *et al.*, 2005; Boyle, 2011). Entretanto, uma nova geração de fármacos já vem sendo testada, buscando-se atingir o melanoma mais

especificamente. Por exemplo, o vemurafenib (PLX4032), recentemente liberado para uso pelo FDA (*Food and Drug Administration*), tem como alvo o gene *B-Raf* mutado, com seletividade de até 30 vezes em relação ao gene *B-Raf* normal (Marquez-Rodas, Martin Algarra *et al.*, 2011; Nikolaou, Stratigos *et al.*, 2012). Outras drogas seletivas para genes frequentemente mutados no melanoma também estão sendo desenvolvidas e se encontram em fase de teste, como o Nilotinib, um inibidor do receptor tirosina quinase c -KIT, o tibifarnib, um inibidor do gene *ras* mutado e o NVP-BEZ235, inibidor da via da fosfatidilinositol 3-quinase – PI3K (Boyle, 2011; Marquez-Rodas, Martin Algarra *et al.*, 2011; Nikolaou, Stratigos *et al.*, 2012). A modulação do sistema imune do hospedeiro, a fim de neutralizar o melanoma, também tem sido alvo das pesquisas. O ipilimumab é uma das drogas que vem sendo testadas para esse fim (Boyle, 2011; Marquez-Rodas, Martin Algarra *et al.*, 2011; Nikolaou, Stratigos *et al.*, 2012).

## 2.2 MELANINAS

A melanina é um pigmento sintetizado pelos melanócitos a partir do processo de oxidação da L-tirosina. Os melanócitos estão presentes na epiderme, juntamente com os queratinócitos, numa razão de 1:10, respectivamente. Além de constituírem uma população menor, os melanócitos também se proliferam muito lentamente em condições normais, ao contrário do que acontece com os queratinócitos (Yamaguchi, Brenner *et al.*, 2007).

A síntese da melanina ocorre nos melanossomos; organelas derivadas de lisossomos. Após sua síntese, esses pigmentos são exocitados através dos longos dendritos dos melanócitos, na forma de pequenos polímeros que se aderem aos queratinócitos da camada granulosa, onde se condensam e encapam o núcleo celular (Figura 4). Esta “capa” de melanina ao redor do núcleo celular dos queratinócitos pode proteger o DNA contra os efeitos da radiação UV, uma vez que as melaninas são capazes de absorver fótons, um efeito conhecido como *blackout* (Yamaguchi, Brenner *et al.*, 2007). Em função da sua capacidade de absorver a radiação na região do UV, tem sido proposto um papel protetor das melaninas, mas outras propriedades também devem contribuir para esse efeito. Uma possibilidade é



a habilidade das melaninas de remover espécies reativas de oxigênio (EROS) ou de inibir sua formação (Hoogduijn, Cemeli *et al.*, 2004).

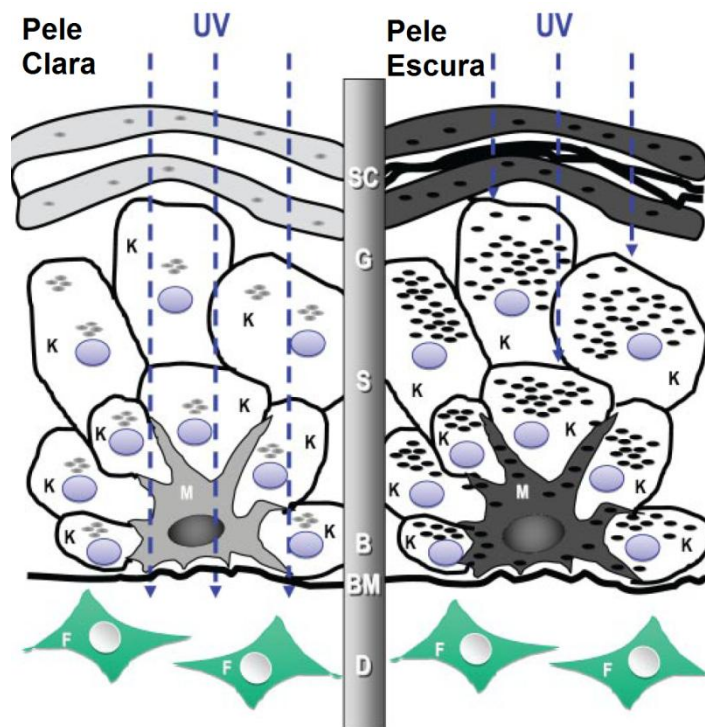


FIGURA 4: ESQUEMA DA ARQUITETURA DA PELE CLARA E ESCURA.

FONTE: Adaptado de Yamaguchi, Brenner e colaboradores (2007)

NOTA: Na pele escura, a melanina pode funcionar como filtro contra a radiação UV (efeito *blackout*), minimizando seus efeitos deletérios sobre as células. Legenda: SC: estrato córneo; G: estrato granuloso; S: estrato espinhoso; B: estrato basal; BM: membrana basal; D: derme. Tipos celulares: K: queratinócito; M: melanócito; F: fibroblasto. Estruturas ovais: grânulos de melanina.

Como já mencionado anteriormente, existem 2 principais classes de melaninas: a eumelanina e a feomelanina. Esta classificação depende principalmente da cor, solubilidade e da presença de enxofre em sua composição.

A eumelanina (Figura 5) é um polímero nitrogenado polimorfo, marrom ou preto, insolúvel na maioria dos solventes. É formada, predominantemente, por dihidroxi-indol (DHI) e ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA). Em geral, esse pigmento se comporta como um poliânion, além disso, é encontrado em forte associação com proteínas por ligações covalentes (Chedekel, Ahene *et al.*, 1992).

Já a feomelanina (Figura 5) possui uma estrutura formada por unidades de benzotiazinas, resultantes de cisteinil-DOPAs formadas pela ligação de resíduos de

cisteína com a dopaquinona durante o processo de polimerização. Esse pigmento exibe coloração vermelha ou amarela e é solúvel em soluções alcalinas. Diferentemente da eumelanina, que possui apenas o heteroátomo nitrogênio em sua estrutura, a feomelanina apresenta tanto nitrogênio como enxofre. A feomelanina se liga a proteínas e também pode agir como ligante para drogas, cálcio e compostos químicos diversos (Mars e Larsson, 1999).

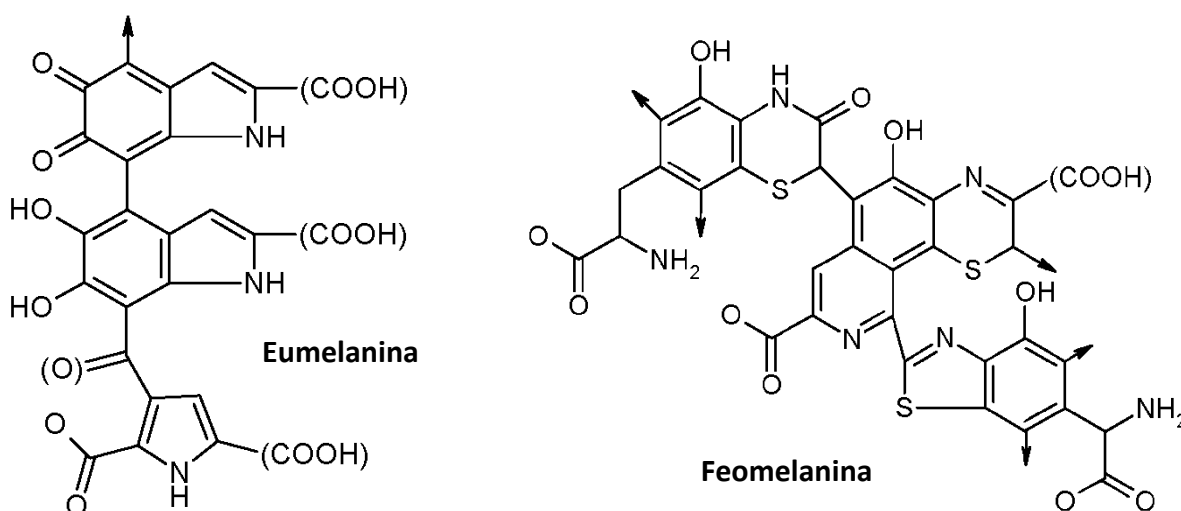


FIGURA 5: ESTRUTURA MOLECULAR DA FEOMELANINA E EUMELANINA.

FONTE: adaptado de Ito e Wakamatsu (2008).

NOTA: As setas (→) representam locais de ligação de outras unidades monoméricas.

As melaninas têm sido alvo de muitos estudos, durante muitas décadas. Além da já comentada capacidade de absorver luz, é notável a sua capacidade de se ligar a cátions (Potts e Au, 1976) e a drogas, como o paraquat e a clorpromazina (Mars e Larsson, 1999), além de ser *scavenger* de radicais livres (Sichel, Corsaro *et al.*, 1991; Dunford, Land *et al.*, 1995; Rozanowska, Sarna *et al.*, 1999; Tada, Kohno *et al.*, 2010). De forma contrária, as melaninas também levam à geração de EROS, tanto espontaneamente no escuro, quanto sob a luz (Korytowski, Pilas *et al.*, 1987). Neste último caso, o rendimento da produção de EROS é maior, sendo assim, as melaninas são consideradas fotossensibilizadores (Chedekel, Smith *et al.*, 1978; Felix, Hyde *et al.*, 1978; Korytowski e Sarna, 1990). Para efeito de ilustração, estão representados na figura 6 os grupamentos responsáveis pelas inúmeras propriedades das melaninas, tanto quando estas atuam na absorção de fótons,

quanto quando exercem um papel em reações redox, doando ou recebendo elétrons ou se ligando a íons positivamente carregados.

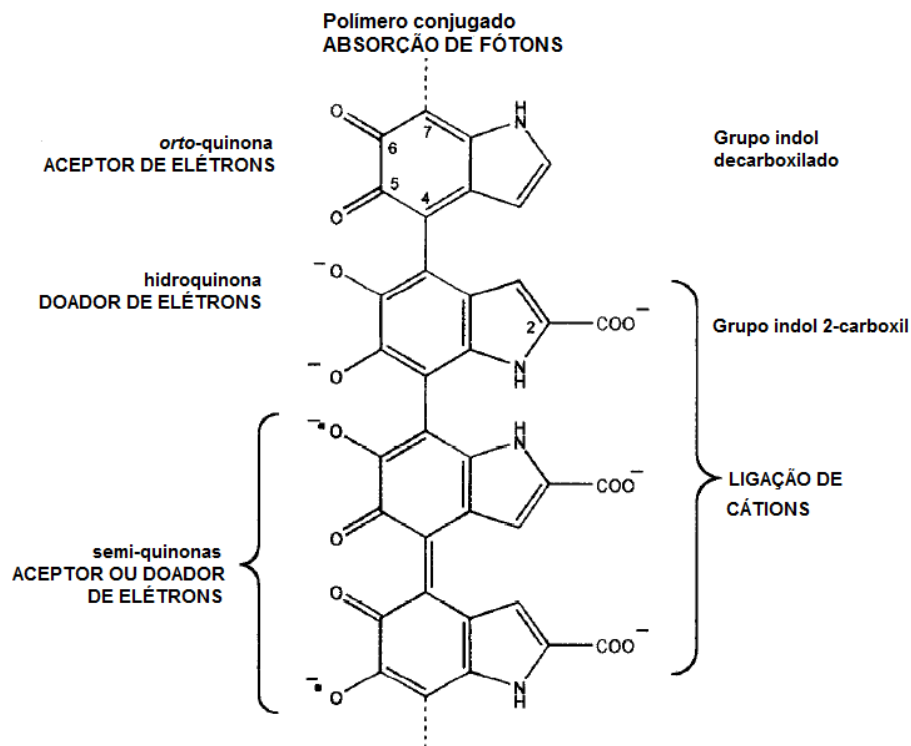


FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS GRUPOS RESPONSÁVEIS PELAS PROPRIEDADES DAS MELANINAS.

FONTE: Riley (1997).

NOTAS: Algumas das características das melaninas estão relacionadas às suas propriedades eletrônicas, a saber: absorção de fótons, reações redox (funcionando como aceptoras ou doadoras de elétrons) e ligação à cátiões.

### 2.2.1 Biossíntese das melaninas

O primeiro passo da síntese da eu- e da feomelanina são idênticos e envolve a oxidação da L-tirosina pela enzima tirosinase (atividade de monofenolase), também conhecida como polifenol oxidase, cresolase ou catecolase. A tirosinase é a enzima limitante da via melanogênica e atua na formação da dopaquinona (o-quinona da 3,4-dihidroxifenilalanina). Outro possível substrato para a tirosinase é a L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), gerando o mesmo produto, dopaquinona, através da sua atividade de difenolase. Já foi proposto que, durante a ação da tirosinase sobre a L-DOPA, ocorre geração de  $O_2^{\cdot -}$  (Koga, Nakano *et al.*, 1992; Komarov, Slepneva *et al.*, 2005), embora a ação direta do  $O_2^{\cdot -}$  não pareça ser importante na

oxidação da L-DOPA ou da hidroxilação da tirosina durante o processo da melanogênese (Kahn, Golan-Goldhirsh *et al.*, 1983).

A dopaquinona (DQ) é um intermediário muito reativo. Na ausência de compostos sulfidrilas, ocorre preferencialmente a eumelanogênese. A este respeito, é interessante notar que, numa situação de privação de cisteína, a síntese de eumelanina é favorecida, em detrimento à feomelanogênese (Del Marmol, Ito *et al.*, 1996). Para a síntese da eumelanina, inicialmente, o grupamento amino da DQ se adiciona ao seu grupo aromático (reação intramolecular), gerando ciclodopa (também chamado de leucodopacromo). A ciclodopa pode reagir com a DQ com constante de reação na ordem de  $5,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Land, Ito *et al.*, 2003), gerando assim o dopacromo, que dará origem aos grupamentos indol do polímero de eumelanina. Durante esta última reação, há regeneração da L-DOPA. O dopacromo, então, é rearranjado para formar o DHI e, se sofrer ação da enzima Tyrp2 (proteína 2 relacionada à tirosinase, também conhecida como dopacromo tautomerase - Dct), gera DHICA. O DHI pode ser novamente oxidado pela ação da DQ; já o DHICA sofre oxidação pela Tyrp1 (proteína 1 relacionada à tirosinase, também chamada de DHICA oxidase) em murinos ou pela tirosinase, em humanos. Após polimerização dos produtos, obtém-se o pigmento eumelanina (Ito e Wakamatsu, 2008), conforme ilustrado na figura 7.

Já quando a dopaquinona se encontra na presença de compostos contendo enxofre, como a cisteína, há formação da feomelanina. Neste caso, ocorre um ataque nucleofílico do grupamento tiol da cisteína no grupo quinona da dopaquinona, formando assim os isômeros 2-S-cisteinildopa e 5-S-cisteinildopa (principalmente este último). As cisteinildopas podem ser oxidadas pela DQ com constante de reação na ordem de  $8,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (Land e Riley, 2000), ou seja, cerca de 6 vezes menor do que a reação que favorece a eumelanogênese. As quinonas resultantes podem sofrer ciclização intramolecular e dar origem às benzotiazinas. Após polimerização, há formação da feomelanina (Ito e Wakamatsu, 2008). Na figura abaixo estão esquematizados os passos da via de síntese de ambos os tipos de melanina:



na oxidação dos precursores da melanina, para a formação de sua forma polimérica (Mastore, Kohler *et al.*, 2005). De forma interessante, se por um lado a via melanogênica é uma fonte de EROS, quando células de melanoma B16 foram tratadas com 0,5 mM de  $H_2O_2$ , houve diminuição da atividade e da expressão da enzima tirosinase, seguida por redução do conteúdo de melaninas nestas células. Este efeito, aparentemente, está relacionado à menor expressão do fator de transcrição *Mitf* após o tratamento com o  $H_2O_2$ , o que sugere uma regulação da melanogênese em função do estado oxidativo celular (Jimenez-Cervantes, Martinez-Esparza *et al.*, 2001).

Um estudo em modelo celular reforça a relação entre a via melanogênica e a produção de EROS. Foi demonstrado que, quando melanócitos humanos normais eram estimulados a sintetizar melanina (pelo tratamento com tirosina), havia aumento dos níveis de EROS (observado pela utilização da sonda rodamina 123). Neste mesmo estudo, os autores também compararam melanócitos normais e nevos displásicos. Foi observado que os nevos displásicos apresentavam maior relação feomelanina / eumelanina, maior produção de EROS e maiores níveis de sítios álcali-lábeis e lesões sensíveis à FPG em seu DNA, avaliado pela utilização do ensaio cometa (Smit, Van Nieuwpoort *et al.*, 2008). Recentemente, em nosso grupo, foi demonstrado que o estímulo da eumelanogênese em células de melanoma murino B16-F10, pela utilização de tirosina e cloreto de amônio, leva ao aumento da geração de EROS intracelular, verificado pela utilização da sonda DCFH-DA (Cunha, Kawahara *et al.*, 2012).

O metabolismo da glutathione e a via melanogênica também parecem estar relacionados. Já foi demonstrado que a glutathione pode servir como fonte de enxofre para a geração de cisteinildopas em células de melanoma (Mojamdar, Ichihashi *et al.*, 1982). Por outro lado, a glutathione é relatada como um agente despigmentante. Numa revisão realizada por Villarama e Maibach (2005), os autores discutem os mecanismos propostos para a ação despigmentante da glutathione, a saber: inibição direta da tirosinase, pela ligação ao sítio ativo da enzima; favorecimento da feomelanogênese, em detrimento da eumelanogênese; sequestro de EROS importantes para a atividade da tirosinase e para os passos redox da melanogênese; e, por fim, modulação de outros agentes despigmentantes.

### 2.2.2 Regulação da melanogênese

A melanogênese pode ser regulada por diferentes fatores. Dentre eles, encontram-se os fatores intrínsecos ao melanócito, que envolvem a biogênese do melanossomo (incluindo a síntese de enzimas relacionadas à melanogênese, proteínas estruturais e receptores) e o seu transporte da região perinuclear, onde são sintetizados, até a membrana plasmática (Yamaguchi, Brenner *et al.*, 2007; Yamaguchi e Hearing, 2009). Dentre os fatores extrínsecos, destaca-se a radiação UV, uma vez que esta pode gerar danos no DNA de queratinócitos e, conseqüentemente, aumentar a expressão do oncogene *p53*. Isto acarreta no aumento da expressão de POMC (pró-opiomelanocortina) e na liberação de  $\alpha$ -MSH (hormônio estimulador de melanócitos  $\alpha$ ), conforme ilustrado na figura 8. A ação do  $\alpha$ -MSH sobre os melanócitos (via receptor MC1R – receptor de melanocortina 1) leva ao aumento da expressão de enzimas envolvidas da via de síntese das melaninas, o que resulta no aumento de pigmentação nestas células (Gilchrest e Eller, 1999; Lin e Fisher, 2007; Yamaguchi e Hearing, 2009).

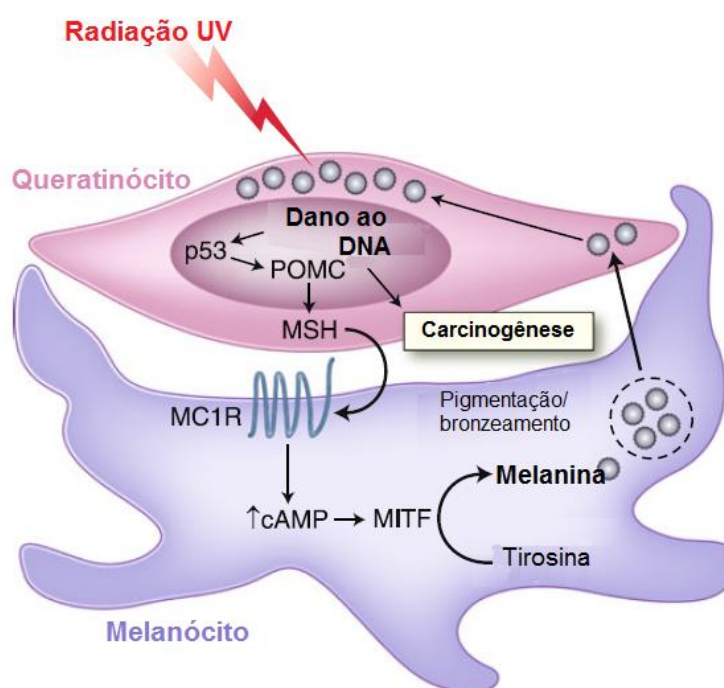


FIGURA 8: ESQUEMA SIMPLIFICADO DE ALGUNS DOS PASSOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA ESTIMULAÇÃO DA SÍNTESE DE MELANINA PELA RADIAÇÃO UV.

FONTE: adaptado de Garibyan e Fischer (2010).

NOTA: A radiação UV estimula a síntese de melanina por causar danos no DNA dos queratinócitos. Este dano leva à ativação de *p53* que, por sua vez, aumenta a expressão de POMC. Após clivagem, o POMC dá origem ao hormônio  $\alpha$ -MSH. Este é secretado e interage com o receptor de membrana MC1R dos melanócitos, levando a um aumento dos níveis de AMPc (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico). Em resposta, há aumento do fator de transcrição MITF, que estimula a síntese de melanina. O acúmulo de melanina confere a aparência de bronzeamento.

A síntese de melaninas nos melanócitos é principalmente regulada pelos ligantes de MC1R. A família das melanocortinas é composta por 5 genes que codificam para receptores acoplados à proteína G, MC1R à MC5R, todos eles contendo 7 domínios transmembrana. Em humanos, a MC1R é expressa em melanócitos; MC2R, no tecido adrenal e adiposo; MC3R, no cérebro; MC4R, no cérebro, músculo e tecido adiposo e MC5R, ubiquamente. Em roedores, esta distribuição é similar. Desta maneira, a família de receptores de melanocortina regula a pigmentação, lipólise, ingesta alimentar, termogênese, comportamento sexual, memória e possui efeitos anti-inflamatórios. O MC1R possui 317 aminoácidos e possui localização cromossômica 16q24.3. A expressão de MC1R é estimulada por radiação UV,  $\alpha$ -MSH, hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (mecanismo de *feedback* positivo), além de citocinas e fatores de crescimento (Schaffer e Bolognia, 2001).

A função do MC1R é coordenada por 3 fatores: 2 agonistas ( $\alpha$ -MSH e ACTH) e 1 antagonista (ASP –proteína *agouti*). O  $\alpha$ -MSH é um peptídeo de 13 aminoácidos que pode se ligar nos receptores MC1R, MC3R, MC4R e MC5R. Já o ACTH liga-se ao MC1R, MC2R, MC4R e MC5R. Ambos os ligantes são derivados de uma mesma proteína precursora, a POMC (pró-opiomelanocortina). Por outro lado, o ASP exerce efeito antagônico em todos os receptores (Voisey, Kelly *et al.*, 2003; Le Pape, Wakamatsu *et al.*, 2008), conforme esquematizado na figura 9.



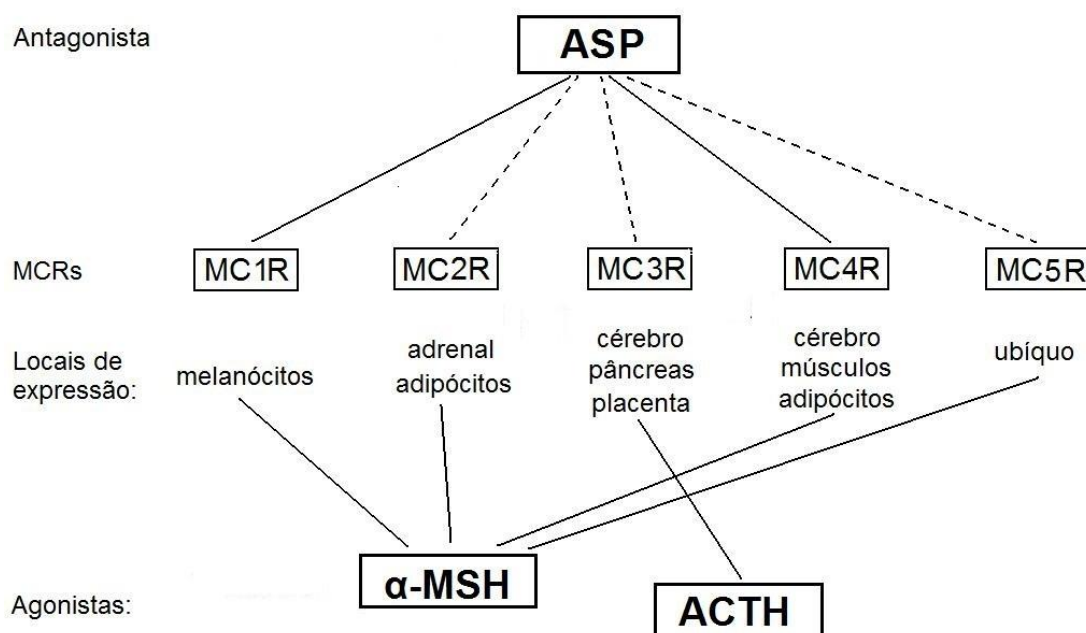


FIGURA 9: AGONISMO E ANTAGONISMO DOS RECEPTORES DE MELANOCORTINA.

FONTE: adaptado de Voisey, Kelly e colaboradores (2003).

NOTAS: O ACTH e o  $\alpha$ -MSH são ligantes dos receptores de melanocortinas, enquanto o ASP tem função de antagonista, agindo sobre os receptores MCR com diferentes intensidades. As linhas contínuas indicam alta afinidade, enquanto as linhas pontilhadas indicam baixa afinidade pelos receptores.

O tipo de melanina que é sintetizado depende do fator que está ligado ao MC1R. A síntese de eumelanina é estimulada pelo  $\alpha$ -MSH, enquanto a síntese da feomelanina, em murinos, é principalmente regulada pelo ASP. Mutações no locus do MC1R levam ao fenótipo recessivo amarelo, pois os melanócitos tornam-se irresponsivos ao  $\alpha$ -MSH (Abdel-Malek, Knittel *et al.*, 2008).

Quando há ligação do  $\alpha$ -MSH ao receptor, a subunidade do receptor acoplada à proteína G ativa a adenilato ciclase, aumentando a produção do mensageiro secundário AMPc. O aumento do AMPc leva à fosforilação dos fatores de transcrição CREB (elemento responsivo ao AMPc). Vários genes são assim ativados, entre eles, o *Mitf* (fator de transcrição da microftalmia), resultando na estimulação da tirosinase (em nível de expressão gênica e de atividade), proliferação de melanócitos e aumento da quantidade de dendritos (Schaffer e Bolognia, 2001). Variantes de MC1R têm sido relacionadas à sensibilidade a danos ao DNA causados por radiação UV (Scott, Wakamatsu *et al.*, 2002), aumento da

susceptibilidade ao desenvolvimento de melanoma (Kennedy, Ter Huurne *et al.*, 2001) e câncer de pele do tipo não-melanoma (Bastiaens, Ter Huurne *et al.*, 2001).

Em humanos, foi encontrada a proteína ASIP, altamente homóloga à ASP murina (mais de 80 % de homologia). A ASIP possui 132 aminoácidos e é codificada pela região cromossomal 20q11.2 (Kwon, Bultman *et al.*, 1994). É sintetizada por células da papila dermal e exerce sua função de controle de produção de melanina sobre os melanócitos de forma parácrina. Há indícios (Tota, Smith *et al.*, 1999) de que sua função de antagonista competitivo de  $\alpha$ -MSH está relacionada ao mimetismo conformacional proporcionado por um *loop* de 8 peptídeos existente entre Cys-110 e Cys-117, na região carboxi-terminal (na estrutura de ASIP, são encontrados 10 resíduos de cisteína, que dão origem a 5 pontes dissulfeto intramolecular). Embora polimorfismos de ASIP estejam associados à diferentes fenótipos (Kanetsky, Swoyer *et al.*, 2002), além de sardas e susceptibilidade ao sol (Sulem, Gudbjartsson *et al.*, 2008), esta proteína parece modular de forma distinta a melanogênese humana, quando comparada à modulação murina. Enquanto a ASP murina parece modular diretamente a síntese de melanina por diminuir a expressão de TRP-1 e TRP-2 (Sakai, Ollmann *et al.*, 1997), a transcrição gênica de enzimas relacionadas à melanogênese não parece ser afetada por ASIP (Voisey, Kelly *et al.*, 2003).

Outros fatores também parecem influenciar o controle da produção dos dois tipos de melanina. Dentre eles, pode-se citar a atividade da enzima dopacromo tautomerase (Hirobe, Wakamatsu *et al.*, 2006), alterações do pH no melanossomo (Ancans, 2001), a expressão de TRP-1 e TRP-2 (Kobayashi, Vieira *et al.*, 1995) e a expressão de transportadores de cisteína (Chintala, Li *et al.*, 2005).

## 2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

### 2.3.1 EROS biologicamente importantes

Algumas das EROS biologicamente importantes estão listadas na tabela 01. As EROS de relevância para este trabalho serão mais bem descritos em seguida:

RADICAIS	NÃO-RADICAIS
Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxil ( $\cdot OH$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Radical peroxil ( $RO_2^{\cdot}$ )	Ozônio ( $O_3$ )
Radical alcóxil ( $RO^{\cdot}$ )	Oxigênio Singlete ( $^1\Delta g$ )
Hidroperóxil ( $HO_2^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ )

TABELA 1: EROS BIOLOGICAMENTE RELEVANTES.

FONTE: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007).

- **Radical Hidroxila ( $\cdot OH$ )**: o radical  $\cdot OH$  é altamente reativo frente a todas as biomoléculas (açúcares, proteínas, DNA, lipídeos, etc). Pode ser gerado através da fissão homolítica da água pela radiação UV e pela radiação ionizante (por exemplo, os raios  $\gamma$ ), pela reação do ácido hipocloroso com o ânion superóxido ( $HOCl + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + Cl^- + \cdot OH$ ), pela ação do ultrassom na água, entre outros. Na biologia celular, uma importante fonte de  $\cdot OH$  é a reação de Fenton, que envolve a reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição, como o  $Cu^+$  e o  $Fe^{2+}$ :



O radical  $\cdot OH$  pode sofrer 3 tipos de reação: abstração de hidrogênio, adição e transferência de elétrons. A abstração de hidrogênio pode ocorrer na reação do  $\cdot OH$  com alcoóis, onde o  $\cdot OH$  abstrai um  $\cdot H$  do álcool, resultando em água e em um radical derivado do álcool, com um elétron desemparelhado no carbono  $\alpha$ . Já as reações de adição ocorrem quando há reação do  $\cdot OH$  com compostos aromáticos e com ligações duplas. Na reação do  $\cdot OH$  com íons haletos ocorre o processo de transferência de elétrons (Halliwell e Gutteridge, 2007).

- **Peróxido hidrogênio ( $H_2O_2$ )**: apesar do  $H_2O_2$  não ser um radical livre, é altamente tóxico para células na faixa de 10 a 100  $\mu M$ . Sua toxicidade é relacionada, principalmente, à sua habilidade de se difundir através das membranas biológicas e de gerar radicais  $\cdot OH$ , tanto pela reação de Fenton, como pela fissão homolítica catalisada pela radiação UV (Halliwell e Gutteridge, 2007).

- **Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )**: o  $O_2^{\cdot-}$  é muito menos reativo que o  $\cdot OH$ , reagindo muito pouco com moléculas não radicais. Porém, é altamente reativo frente a radicais, como o óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), gerando outras espécies, algumas vezes, muito reativas, como o peroxinitrito ( $ONOO\cdot$ ). Outra característica do  $O_2^{\cdot-}$  é a habilidade de sofrer dismutação espontânea, que consiste na reação de 2 radicais  $O_2^{\cdot-}$ , gerando  $H_2O_2$  ( $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) e de reduzir metais de transição, como o ferro ( $Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ ) (Halliwell e Gutteridge, 2007). Pode ser gerado por algumas enzimas (ex: xantina oxidase), radiólise de pulso, durante a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e pela autooxidação de quinonas (Heikkila e Cohen, 1973).
- **Oxigênio singlete ( $^1O_2$ )**: O oxigênio molecular singlete ( $^1O_2$ ) é definido como o oxigênio molecular eletronicamente excitado, o que o torna altamente reativo frente às biomoléculas. Tendo em vista a sua relevância neste trabalho, as propriedades do  $^1O_2$  serão melhores detalhadas a seguir.

### 2.3.2 Oxigênio Molecular Singlete

O oxigênio molecular ( $O_2$ ), presente no ar que respiramos, é classificado como um radical livre, pois, como pode ser observado na figura 10, ele possui 2 elétrons desemparelhados, cada um localizado em orbitais  $\pi^*$  diferentes. Embora seja um radical livre, o  $O_2$  possui baixa reatividade, pois os 2 elétrons desemparelhados mencionados anteriormente têm *spins* paralelos. Assim, para que o  $O_2$  atue como agente oxidante de algum átomo ou molécula, é necessário que ele aceite um par de elétrons que também tenham o mesmo *spin*, para preencher os espaços livres dos orbitais  $\pi^*$ . Como isso contraria o Princípio de Pauli (onde um par de elétrons em orbitais atômicos ou moleculares deve ter *spins* opostos), ocorre um fenômeno conhecido como restrição de *spin*, que faz com que o  $O_2$  aceite 1 único elétron de cada vez. Isso torna o  $O_2$  pouco reativo frente a não-radicaís, mas bastante reativo frente a radicais, pela transferência de um elétron (Halliwell e Gutteridge, 2007).

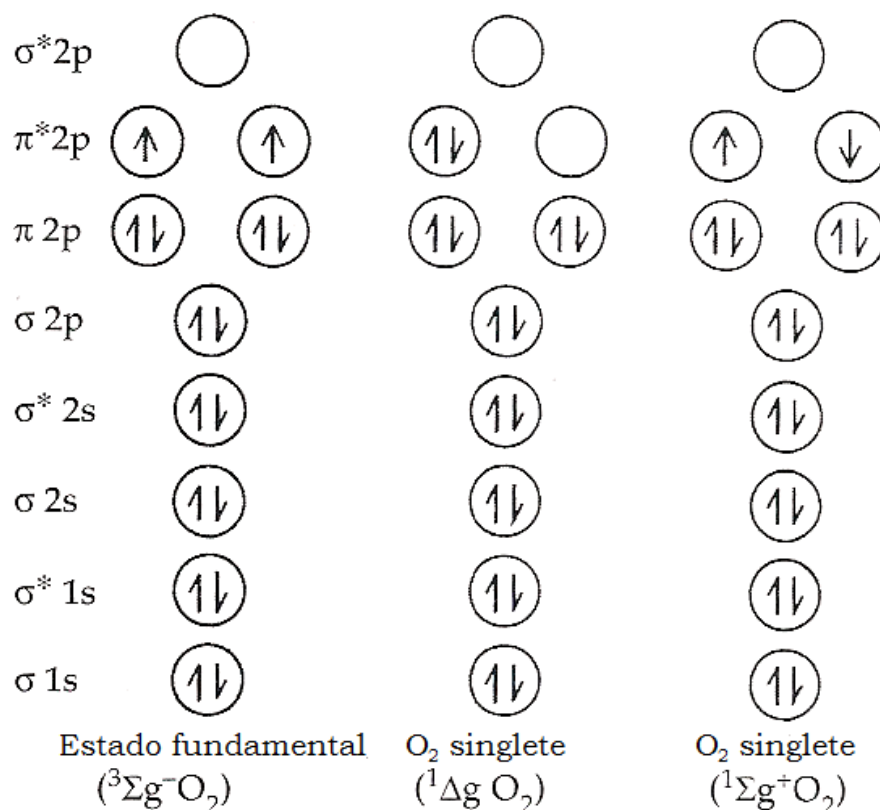


FIGURA 10: DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA DO OXIGÊNIO MOLECULAR NOS ESTADOS FUNDAMENTAL E SINGLETE.

FONTE: adaptado de Halliwell e Gutteridge (2007).

NOTAS: A figura mostra a distribuição eletrônica do oxigênio molecular em seu estado fundamental e de seus estados singlete. Observa-se que, no estado fundamental, o oxigênio molecular apresenta 2 elétrons desemparelhados, com *spins* paralelos. Já no estado  ${}^1\Delta_g$ , não existem elétrons desemparelhados.

Quando o  $\text{O}_2$  recebe energia, ele passa às suas formas singlete, altamente reativas, representadas na figura 10. Sua alta reatividade se justifica pela remoção da regra de *restrição de spin*, presente no  $\text{O}_2$ . Existem 2 estados que representam a forma singlete do  $\text{O}_2$ : o  ${}^1\Sigma_g^+$  e o  ${}^1\Delta_g$ . O estado  ${}^1\Sigma_g^+$  é o mais reativo (veja tabela 2), mas decai rapidamente ao estado  ${}^1\Delta_g$ , o que faz que apenas este último seja considerado relevante nos sistemas biológicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Assim, neste trabalho, o termo oxigênio molecular singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ) dirá respeito ao estado  ${}^1\Delta_g$ .

Estado	Energia acima do estado fundamental	Tempo de vida (s)
$^3\Sigma_g^-$	-	-
$^1\Delta_g$	93,6 kJ.mol <sup>-1</sup> (22,4 kcal.mol <sup>-1</sup> )	10 <sup>-6</sup>
$^1\Sigma_g^+$	157 kJ.mol <sup>-1</sup> (37,5 kcal.mol <sup>-1</sup> )	10 <sup>-11</sup>

TABELA 2: CARACTERÍSTICAS DOS ESTADOS FUNDAMENTAL E ATIVADO DO OXIGÊNIO MOLECULAR.

FONTE: Adaptado de Di Mascio, Medeiros e colaboradores (1995)

NOTA: Na tabela estão apresentadas as propriedades de 2 estados do oxigênio molecular, quando excitado eletronicamente: o  $^1\Delta_g$  e o  $^1\Sigma_g^+$ . Como pode ser observado, o estado  $^1\Sigma_g^+$  é mais energético (157 versus 93,6 kJ.mol<sup>-1</sup>), mas seu tempo de vida é muito curto. Sendo assim, o estado  $^1\Delta_g$  é considerado o mais relevante quanto aos seus efeitos em sistemas biológicos.

A energia de decaimento do  $^1O_2$  ao estado fundamental é transmitida para o solvente em forma de vibração. Assim, o tempo de vida do  $^1O_2$  depende do meio no qual ele é gerado, sendo que, solventes com frequência vibracional maior aceleram o decaimento do  $^1O_2$ . Assim, em soluções aquosas, onde o grupo hidroxila tem uma alta vibração ( $\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ ), o tempo de vida do  $^1O_2$  é muito pequeno ( $\sim 3,8\text{ }\mu\text{s}$ ). Quando o isótopo  $^1\text{H}$  da água é substituído por  $^2\text{H}$  (água deuterada,  $\text{D}_2\text{O}$ ), há diminuição da frequência da vibração, resultando num aumento de cerca de 20 vezes no tempo de vida do  $^1O_2$ , ou seja, para cerca de  $62\text{ }\mu\text{s}$  (Foote, 1995). Esta característica é frequentemente utilizada como estratégia em experimentos que buscam comprovar o papel do  $^1O_2$  em diferentes modelos.

### 2.3.3 Fontes de Oxigênio Molecular Singlete

O  $^1O_2$  pode ser gerado por diferentes fontes, a saber:

- **Geração química**: O  $^1O_2$  pode ser formado por reações químicas, como a decomposição de hidroperóxidos de lipídeos em radicais peroxil (Miyamoto, Ronsein *et al.*, 2007), a reação entre  $\text{H}_2\text{O}_2$  + hipoclorito ( $\text{OCl}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} + ^1\text{O}_2$ ) e a reação entre o ozônio com algumas biomoléculas, como a glutatona oxidada (GSSG), cisteína, albumina e ácido úrico (Halliwell e Gutteridge, 2007).
- **Geração biológica**: em alguns processos biológicos, como a fagocitose, biossíntese de prostaglandinas e atividade enzimática (ex: lipoxigenases e

dioxigenases), já foi descrita a formação de  $^1\text{O}_2$  (Kanofsky, 1989; Steinbeck, Khan *et al.*, 1992).

- **Radiação ultravioleta A:** Em sistemas biológicos, é aceito que a radiação ultravioleta A (UVA) pode levar a formação de  $^1\text{O}_2$  (Klotz, Holbrook *et al.*, 2001; Baier, Maisch *et al.*, 2007).
- **Fotossensibilização:** O método de fotossensibilização baseia-se no uso de uma molécula fotossensibilizadora (PTS) que, quando exposta à luz em um determinado comprimento de onda (luz ultravioleta ou visível), absorve energia do fóton ( $h\nu$ ), ficando em um estado excitado singlete ( $^1\text{PTS}^*$ ) que é rapidamente convertido a um estado tripleto ( $^3\text{PTS}^*$ ). Como o tempo de vida do  $^3\text{PTS}^*$  é mais longo, ele pode transferir seu elétron para o solvente ou outro substrato, levando à formação de radicais que, após interação com  $\text{O}_2$ , levam à geração de EROS como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\cdot\text{OH}$  (reação do tipo I). Alternativamente, o  $^3\text{PTS}^*$  pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio molecular dissolvido na solução, gerando  $^1\text{O}_2$  pelo mecanismo do tipo II (Kochavar e Redmond, 2000), conforme ilustrado na figura 11. Menos de 1 % das reações do  $^3\text{PTS}^*$  com o  $\text{O}_2$  gera  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Foote, 1991). Os dois tipos de reação (tipo I e II) podem ocorrer simultaneamente e a razão entre elas depende do tipo do fotossensibilizador, da concentração de  $\text{O}_2$  (em condições aeróbicas, a ocorrência do mecanismo tipo II é bastante favorecido em relação ao tipo I), da eficiência da transferência de energia do PTS para o  $\text{O}_2$  e da interação do fotossensibilizador com o substrato (Henderson e Dougherty, 1992; Kochavar e Redmond, 2000; Buytaert, Dewaele *et al.*, 2007). Quando a fotossensibilização é utilizada na clínica (PDT), o mecanismo do tipo II é o mais relevante (Niedre, Patterson *et al.*, 2002). O maior rendimento de  $^1\text{O}_2$  acontece com fotossensibilizadores que possuem um rendimento quântico alto de  $^3\text{PTS}^*$  e tem um longo tempo de vida no estado tripleto (temos, como exemplo, o Rosa Bengala, o PTS utilizado neste estudo). Ao final, a molécula do PTS é regenerada e pode participar, novamente, de um novo ciclo. Em geral, uma molécula de PTS pode gerar entre  $10^3$  a  $10^5$  moléculas de  $^1\text{O}_2$  antes de ser destruído pelo próprio  $^1\text{O}_2$  ou por outro tipo de reação (Kochavar e Redmond, 2000).

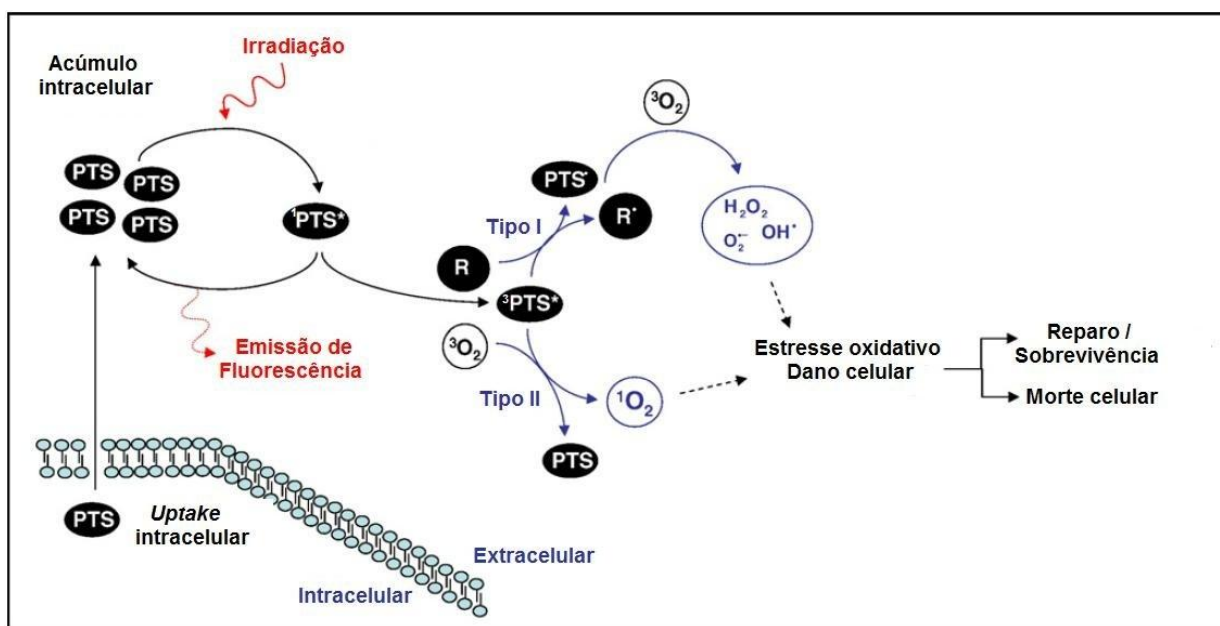


FIGURA 11: ESQUEMA DO PROCESSO DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO.

FONTE: modificado de Buytaert, Dewaele e colaboradores (2007).

NOTA: Legenda: PTS: fotossensibilizador;  $^1\text{PTS}^*$ : fotossensibilizador no estado singlete;  $^3\text{PTS}^*$ : fotossensibilizador no estado triplete; R: substrato.

A quantidade de  $^1\text{O}_2$  gerada por um PTS depende de sua capacidade de absorver fótons (que, por sua vez, depende da concentração do PTS, do coeficiente de extinção molar do PTS, da intensidade da luz e da sobreposição entre o espectro de absorção de luz pelo PTS e o espectro de emissão da fonte luminosa), o rendimento quântico do estado triplete e da eficiência da transferência de energia (Kochear e Redmond, 2000). Abaixo, na tabela 3, são mostradas algumas características de fotossensibilizadores amplamente utilizados:

Fotossensibilizador	Espectro de absorção (nm)	Rendimento quântico de geração de $^1\text{O}_2$ ( $\Phi_\Delta$ )	Solventes
Rosa Bengala	450 – 580	0,76	Água, alcoóis
Azul de metileno	550 – 700	0,52	Água, alcoóis
Fenalenona	< 400	0,95	Solventes orgânicos
Meso-tetrafenil porfirina	300 - 650	0,62	Solventes orgânicos

TABELA 3: CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS FOTOSSENSIBILIZADORES COMUMENTE UTILIZADOS.

FONTE: Kochear e Redmond (2000).



Além dos fotossensibilizadores acima listados, existem vários outros, como a riboflavina, clorofila, bilirrubina, porfirinas, laranja de acridina e o ácido 5-aminolevulínico, sendo que alguns destes vêm sendo testados para o tratamento do melanoma (Davids e Kleemann, 2010).

- **Termodecomposição de endoperóxidos:** A termodecomposição de endoperóxidos em seus derivados de naftaleno é considerada uma fonte limpa de geração de  $^1\text{O}_2$ , uma vez que dispensa o uso de fonte luminosa e o uso de oxidantes fortes, como o  $\text{OCI}^-$ , e se adéquam às necessidades de um ambiente biológico (pH neutro, temperatura e ambiente aquoso). O primeiro relato sobre a ligação reversível do oxigênio à compostos policíclicos aromáticos ocorreu em 1926, por Dufraisse. Ele também descreveu que o oxigênio liberado destas moléculas estava em um “estado ativado”, que hoje se sabe que é o  $^1\text{O}_2$  (Pierlot, Aubry *et al.*, 2000). O endoperóxido derivado do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) possui características interessantes para o uso em sistemas biológicos, pois é estável por meses a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  (podendo, dessa forma, ser armazenado), libera  $^1\text{O}_2$  em temperatura relativamente baixa (ao redor de  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ) e com grande rendimento (cerca de 76 %). Entretanto, devido à sua baixa solubilidade em água, atualmente são utilizados derivados do DMN que, além de serem hidrossolúveis, também são capazes de penetrar nas células e atingir seus alvos, além de apresentarem baixa toxicidade. O DHPN (*N,N'*-di(2,3-dihidroxipropil)-1,4-naftaleno dipropanamida), utilizado neste trabalho, é um dos derivados que preenchem os requisitos citados acima, apresentando boa solubilidade em água ( $0,39\text{ mmol.L}^{-1}$ ). Cerca de 95 % do endoperóxido do DHPN ( $\text{DHPNO}_2$ ), sofre decomposição térmica após 99 min de incubação a  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo que 60 % do oxigênio liberado encontra-se na forma singlete (Pierlot, Aubry *et al.*, 2000).

Para síntese do endoperóxido a partir do derivado de naftaleno, é necessário que o derivado de naftaleno reaja com o  $^1\text{O}_2$ ; para tanto, podem ser utilizadas 2 diferentes fontes de  $^1\text{O}_2$ : a fotossensibilização e a reação entre o molibdato e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 12). Em ambos os casos, usa-se fazer a reação em solventes deuterados, para aumentar o tempo de vida do  $^1\text{O}_2$ .

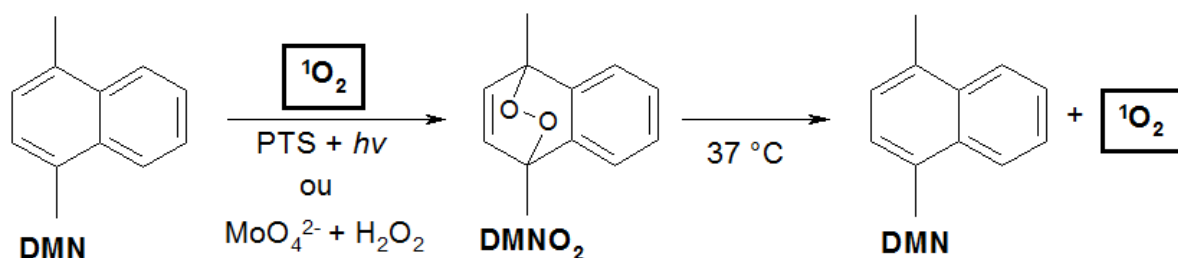


FIGURA 12: SÍNTESE DO ENDOPERÓXIDO A PARTIR DO DERIVADO DE NAFTALENO, DMN, E SUA DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: O endoperóxido (DMNO<sub>2</sub>) é formado a partir da reação do DMN com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, que pode ser gerado a partir de fotossensibilização (PTS + *hν*) ou da reação do molibdato com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é liberado do DMNO<sub>2</sub> após decomposição térmica a 37 °C.

Atualmente, existem alguns métodos para detecção do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> como a detecção de luminescência em 1270 nm (monomol) ou em 630 e 701 nm (dimol). Há, ainda, outras possibilidades como o *trapping* químico e uso de *quenchers* como a azida sódica (Di Mascio, Medeiros *et al.*, 1995; Foote, 1995; Clennan e Pace, 2005).

#### 2.3.4 Efeitos Biológicos do Oxigênio Molecular Singlete

O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> tem sido implicado em diversos tipos de lesão celular, pois pode reagir com diferentes biomoléculas, como proteínas, lipídeos e DNA. Já foi demonstrado que há formação de peróxido de tirosina quando peptídeos e proteínas são expostos ao <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Wright, Bubb *et al.*, 2002). Outros aminoácidos, como a cisteína, metionina, triptofano e histidina também podem formar peróxidos após oxidação pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Embora o estudo acima mencionado tenha sido realizado na ausência de células, é importante ressaltar que, em modelos celulares, já foi observada a formação de peróxidos de proteína após fotossensibilização na presença de Rosa Bengala. Estes peróxidos possuem tempo de vida longo, com tempo de meia-vida de aproximadamente 30 min (Wright, 2003).

Ácidos graxos insaturados, bem como o colesterol, também são alvos do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. O <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pode reagir com estes lipídeos, gerando hidroperóxidos de lipídeos, via reação ene (Girotti, 1998). De forma interessante, quando estes hidroperóxidos de lipídeos são expostos a metais de transição, peroxinitrito ou ácido hipocloroso, há

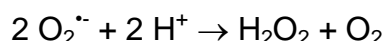
formação de radicais alcoxil e peroxil, responsáveis por propagar o dano. Sob determinadas condições, pode haver a geração de  $^1\text{O}_2$  a partir dos hidroperóxidos de lipídeos que, por sua vez, pode oxidar outras moléculas, aumentando a extensão das lesões (Miyamoto, Ronsein *et al.*, 2007).

Por fim, o  $^1\text{O}_2$  também pode levar a danos no material genético celular. Este tópico será melhor explorado nas seções subsequentes (tópico 2.6.1).

## 2.4 SISTEMA ANTIOXIDANTE CELULAR

Um antioxidante, segundo Halliwell e Gutteridge (2007) é “*qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo em uma molécula-alvo*”. Embora existam diversos tipos de antioxidantes celulares, constituindo assim, barreiras contra as EROS e outras espécies nocivas, aqui serão destacadas as enzimas antioxidantes, a ferritina (uma proteína sequestradora de ferro) e a glutatona, que são de maior relevância para a compreensão deste trabalho. As enzimas de reparo de DNA também são consideradas como pertencentes do sistema antioxidante celular e alguns exemplos serão discutidos na seção 2.6.2.

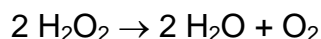
- **Superóxido dismutase (SOD)**: a enzima SOD catalisa a dismutação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através da reação:



Para a catálise, há envolvimento de metais de transição; portanto, a enzima SOD é uma metaloenzima. Existem 3 tipos de SOD em eucariotos, sendo classificadas de acordo com o metal presente em sua estrutura e a sua localização celular: a CuZnSOD e a MnSOD. A CuZnSOD, também conhecida como SOD 1, foi primeiramente descrita por McCord e Fridovich (1969) e contém cobre, que auxilia na sua atividade catalítica, e zinco, que atua na estabilidade da enzima. A CuZnSOD pode ser encontrada no citoplasma celular (dimérica; massa molecular: 32 kDa) e também no espaço extracelular; neste caso, conhecida como SOD ectópica ou SOD3 (tetramérica; massa molecular: 135 kDa). Já a

MnSOD, também chamada de SOD 2, é encontrada no interior das mitocôndrias e contém manganês em seu sítio ativo (Hermes-Lima, 2005).

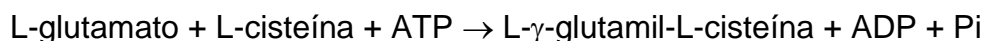
- **Catalase**: a enzima catalase atua na decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio:



A catalase é uma enzima homotetramérica, totalizando uma massa molar de cerca de 240 kDa. Em cada subunidade, são encontrados um grupo prostético  $\text{Fe}^{3+}$ -heme (o ferro participa na catálise) e um cofator, o NADPH. Esta enzima é encontrada primariamente nos peroxissomos (Hermes-Lima, 2005).

- **Glutathiona**: a glutathiona é um tripeptídeo constituído por glutamato, cisteína e glicina, sendo o grupo tiol o responsável por sua relevância biológica. Atua como antioxidante solúvel, pois está presente no meio intracelular na ordem de  $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  e pode reagir diretamente com EROS como  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ONOO}^-$  e  $^1\text{O}_2$ , mas não significativamente com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Halliwell e Gutteridge, 2007). A glutathiona também pode atuar como cosubstrato de enzimas, como a glutathiona peroxidase.

A síntese da glutathiona reduzida (GSH) ocorre no citoplasma e é um processo dependente de ATP (adenosina trifosfato). O primeiro passo envolve a ligação do glutamato à cisteína, pela enzima limitante da via, a  $\gamma$ -glutamilcisteína ligase (também chamada de  $\gamma$ -glutamilcisteína sintase), resultando no dipeptídeo L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteína e no ATP hidrolisado, na forma de ADP (adenosina difosfato) e  $\text{P}_i$  (fosfato inorgânico).

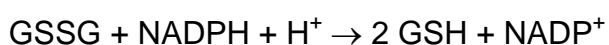


O próximo passo é catalisado pela enzima glutathiona sintetase, que medeia a ligação do resíduo de glicina ao dipeptídeo formado anteriormente, dando origem à GSH.

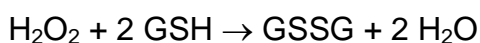


- **Glutathiona redutase (GRed)**: Quando a GSH reage diretamente com EROS, ela pode ser convertida à sua forma oxidada, a GSSG, que é formada por 2

moléculas de GSH ligadas por uma ponte dissulfeto. Como a atividade antioxidante da glutathiona é mediada pelo seu grupamento tiol livre, a GSSG não possui tal atividade, sendo necessário ser reconvertida à sua forma reduzida. A enzima que catalisa a redução da GSSG à GSH é a glutathiona redutase (GRed). A GRed possui 2 subunidades; cada uma contém um FAD (flavina adenina dinucleotídeo) no sítio ativo, que atua na transferência de elétrons para a ponte dissulfeto do GSSG. A força redutora provém do NADPH, que é oxidado durante a redução do GSSG (Halliwell e Gutteridge, 2007).



- **Glutathiona peroxidase (GPx)**: As glutathiona peroxidases são enzimas responsáveis por decompor o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outros derivados de peróxidos. Existem 4 tipos de GPx: a GPx1, chamada também de “isoforma clássica”, é encontrada no citoplasma de mamíferos; a GPx2, que é encontrada no trato intestinal; a GPx3, nos fluidos extracelulares e a GPx4, que possui como particularidade a habilidade de decompor peróxidos derivados de lipídeos. Durante a decomposição dos peróxidos à água, ocorre a oxidação do GSH até GSSG, havendo, assim, consumo desta força redutora. Para exercer sua função redox, a GPx utiliza o selênio como cofator, sendo que as isoformas GPx1, GPx2 e GPx3 são tetraméricas, com 1 átomo de Se em cada subunidade e a isoforma GPx4 é monomérica e contém apenas 1 átomo de Se em seu sítio ativo (Hermes-Lima, 2005; Halliwell e Gutteridge, 2007).



- **Peroxiredoxina (Prdx)**: as peroxiredoxinas (Prdx), também chamadas de tiorredoxina peroxidases, são enzimas capazes de reduzir o  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$  e peróxidos orgânicos. São homodímeros e, ao contrário das demais peroxidases, não possuem grupo prostético: as cisteínas presentes em seus sítios ativos medeiam a atividade catalítica. As Prdx são menos eficazes na detoxificação de peróxidos do que as demais peroxidases (a eficiência de decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por Prdx gira em torno de  $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , enquanto da catalase é de  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  e da GPx,  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ); sua atividade de peroxidase é mais relevante em concentrações fisiológicas de peróxidos, pois seu  $K_m$  é menor do que a da GPx. Sobre o

mecanismo catalítico das Prdx, é conhecido que os peróxidos podem oxidar a Cys N-terminal, resultando em um ácido sulfênico (Cys-SOH). O passo seguinte varia de acordo com a classe de Prdx; na classe 2-Cys típica, a Cys-SOH pode ser atacada pela cisteína carboxi-terminal da outra subunidade, gerando uma ponte dissulfeto intramolecular, que será novamente reduzida através da ação das tioredoxinas. Em concentração maiores de peróxidos, a cisteína do sítio ativo pode ser hiper-oxidada, ou seja, à ácido sulfinico (Cys-SO<sub>2</sub>H) ou sulfônico (Cys-SO<sub>3</sub>H), perdendo sua atividade de peroxidase. As Prdx possuem também outros papéis fisiológicos, atuando como chaperonas ou ainda fazendo parte da sinalização celular (Wood, Schroder *et al.*, 2003; Neumann, Cao *et al.*, 2009).

- **Ferritina:** a ferritina é considerada como parte do sistema antioxidante celular devido à sua habilidade de sequestrar ferro. A ferritina é composta por 24 subunidades, cada uma com massa molar de aproximadamente 20 kDa. É responsável por armazenar o ferro intracelular (majoritariamente no citoplasma), mas também é encontrada no plasma sanguíneo. Os íons Fe entram na ferritina no estado 2+; sendo oxidados a Fe<sup>3+</sup> e, posteriormente, são depositados e armazenados no núcleo como óxidos férricos hidratados e insolúveis, evitando assim que participem de reações redox, como a reação de Fenton (Halliwell e Gutteridge, 2007).

#### 2.4.1 Defesa contra a ação do Oxigênio Molecular Singlete

Diferentemente de outras EROS, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, não existem enzimas antioxidantes que agem diretamente sobre o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Antioxidantes solúveis celulares, como os carotenos, α-tocoferol, bilirrubina, licopeno, poliaminas, compostos sulfurados, histidina, entre outros, conferem proteção contra o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por atuarem como *quenchers* do mesmo. Embora não haja enzimas que atuem sobre o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, existem aquelas que podem agir na decomposição ou no reparo de seus produtos de reação (estes produtos, muitas vezes, podem também ser gerados a partir de outras EROS; assim, o sistema de reparo pode ser efetivo contra diversos agentes agressores). Por exemplo, os lipoperóxidos podem ser removidos enzimaticamente pelas enzimas glutathione peroxidase e glutathione peroxidase de hidroperoxídeos de

fosfolípídeo (Ursini e Bindoli, 1987). Sobre os peróxidos peptídicos e protéicos, a ação direta de tióis (Morgan, Dean *et al.*, 2004) e das enzimas peroxiredoxina 2 e 3 (Peskin, Cox *et al.*, 2010) parece ser bastante importante. Os mecanismos de reparo de danos do DNA serão discutidos mais tarde.

Alguns estudos procuraram relacionar a expressão de enzimas antioxidantes com o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Em um trabalho utilizando como modelo a bactéria *E. coli*, observou-se que quando o regulon *oxyR* (um controlador da expressão de catalase) era inibido, estas células tornavam-se mais susceptíveis à fotossensibilização com Rosa Bengala, além de acumularem maiores níveis de proteína carbonílica. Interessantemente, quando o regulon *oxyR* foi superexpresso, as bactérias apresentavam um aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase após a fotossensibilização, sugerindo que estas enzimas podem estar envolvidas na resistência contra o  $^1\text{O}_2$  (Kim, Kim *et al.*, 2002). Em outro estudo utilizando modelo bacteriano, observou-se que estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* deficientes de SOD eram mais susceptíveis à fotossensibilização pelo Rosa Bengala. Entretanto, o tratamento com  $^1\text{O}_2$  não foi capaz de induzir a expressão de SOD em uma estirpe selvagem de *A. tumefaciens* (Saenkham, Utamapongchai *et al.*, 2008), sugerindo que os níveis basais de SOD já proporcionam proteção contra o  $^1\text{O}_2$ . Por outro lado, um gene homólogo ao da glutathiona peroxidase, o *Gpxh* da alga *Chlamydomonas reinhardtii*, foi positivamente regulado após fotossensibilização do tipo II, mas não do tipo I (Fischer, Eggen *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos de microarranjo de *C. reinhardtii* após fotossensibilização com Rosa Bengala em doses subletais mostraram modulação de alguns genes; sendo que o da glutathiona peroxidase e o da glutathiona S-transferase (putativa) foram positivamente regulados (Ledford, Chin *et al.*, 2007).

O papel do  $^1\text{O}_2$  sobre a modulação da expressão gênica em eucariotos também vem sendo investigado. Como pode ser observado na tabela 4, proteínas envolvidas na resposta ao estresse (como o HO-1 e a HSP70), na modelagem da matriz extracelular (MMP-1), na inflamação (TNF- $\alpha$ ) e também aquelas mediadoras de várias vias de transdução de sinal já foram descritas como tendo sua expressão responsiva à ação do  $^1\text{O}_2$ . Entretanto, a relação entre a expressão e atividade de enzimas antioxidantes em eucariotos e do  $^1\text{O}_2$  foi pouco explorada. De nosso

conhecimento, nenhum estudo avaliou a expressão gênica após o tratamento com  $^1\text{O}_2$  e boa parte do conhecimento sobre a relação entre estes fatores vem de estudos que observaram a resposta celular após a superexpressão ou a inibição das enzimas antioxidantes. Foi observado, em células de câncer de mama humano, que a preservação da viabilidade celular, bem como a integridade da membrana celular é tão maior quanto for o nível de expressão da glutathione peroxidase de hidróperóxidos de lipídeos (Wang, Qian *et al.*, 2001). Em outro trabalho, onde foram utilizados inibidores das enzimas antioxidantes SOD, catalase ou isocitrato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), observou-se que as células de leucemia pró-mielocítica (linhagem HL-60) que estavam sob ação dos inibidores eram mais susceptíveis à fotossensibilização (utilizando o Rosa Bengala como fotossensibilizador), quando avaliada a viabilidade celular. Neste mesmo estudo, foi observado um aumento da razão GSSG/GSH, da produção de EROS, da lipoperoxidação e dos níveis de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo) após a fotossensibilização das células tratadas com os inibidores (Kim, Lee *et al.*, 2006).



		<b>Tecido ou linhagem celular</b>	<b>Fonte de <math>^1\text{O}_2</math></b>	<b>Referência</b>
<b>Regulação da expressão gênica de eucariotos pela geração fotoquímica de <math>^1\text{O}_2</math></b>	Heme oxigenase 1 (HO-1)	Fibroblastos de pele humana	UVA	(Basu-Modak e Tyrrell, 1993)
	Molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1)	Queratinócitos de pele humana	UVA	(Grether-Beck, Olaizola-Horn <i>et al.</i> , 1996)
	Metaloproteinase de matriz 1 (MMP-1)	Fibroblastos de pele humana	UVA, NDPO <sub>2</sub>	(Scharffetter-Kochanek, Wlaschek <i>et al.</i> , 1993)
	Proteína de choque térmico 70 (HSP70)	RIF-1 (fibrosarcoma murino induzido por radiação)	Fotofrina II + luz vermelha	(Gomer, Ferrario <i>et al.</i> , 1988)
	Fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	Macrófagos murinos	Fotofrina II + luz vermelha	(Evans, Matthews <i>et al.</i> , 1990)
<b>Regulação de intermediários da transdução de sinal de organismos eucariotos pela geração fotoquímica de <math>^1\text{O}_2</math></b>	Atividade de ligação do NF- $\kappa$ B	FEK-4 (fibroblastos de pele humana – cultura primária)	UVA	(Vile, Tanewliitschew <i>et al.</i> , 1995)
	Atividade de ligação da proteína ativadora 1 (AP-1)	Queratinócitos humanos	UVA	(Djavaheri-Mergny, Mergny <i>et al.</i> , 1996)
	Ativação da proteína quinase N-terminal de c-Jun 2 (JNK-2)	Fibroblastos de pele humana	UVA e fotossensibilização (Rosa Bengala)	(Klotz, Briviba <i>et al.</i> , 1997)
	Fosfolipase A2 (PLA2)	Queratinócitos humanos	UVA	(Hanson e Deleo, 1990)

TABELA 4: MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E ALTERAÇÃO EM VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL PELO  $^1\text{O}_2$  GERADO FOTOQUIMICAMENTE.

FONTE: adaptado de Ryter e Tyrrell (1998)

## 2.5 ESTADO REDOX EM MELANOMAS

Assim como outras neoplasias, o melanoma possui o seu sistema redox anormal, quando comparado ao tipo celular de origem. Um dos primeiros estudos a sugerir a importância do sistema redox na biologia do melanoma foi o de Chuch e colaboradores (1993). Neste estudo, foi observado que, quando a porção codificante do gene *MnSOD* foi transfectado em células de melanoma da linhagem UACC-903, houve diminuição da capacidade destas células crescerem em ágar e formarem tumores xenográficos em camundongos atímicos, o que aponta para a relevância desta enzima e / ou do  $O_2^{\cdot -}$  no desenvolvimento do melanoma.

Em geral, os estudos demonstram que há um estado mais pró-oxidante em melanomas em relação aos melanócitos, embora os dados de alguns autores sejam conflitantes. Um exemplo disso é o estudo de Sander e colaboradores (2003), onde biópsias de pacientes com melanoma de crescimento superficial foram analisadas quanto à quantidade de catalase, SOD 1, SOD 2 e MDA (malondialdeído, um marcador de lipoperoxidação), através de técnicas imunohistoquímicas e comparadas com o tecido normal circundante. Neste estudo, também foram estudados pacientes com outros tipos de câncer de pele, como o carcinoma basocelular e o carcinoma escamoso. Observou-se que os níveis de todos os parâmetros analisados encontravam-se maiores nas células de melanoma, mas não nos demais tipos de câncer.

Em outro trabalho (Picardo, Grammatico *et al.*, 1996), foram comparadas as atividades de 2 enzimas antioxidantes, SOD e catalase, em melanócitos normais e em células de melanoma, ambas provenientes de cultura primária. Os autores observaram que a atividade da SOD era significativamente maior nas células de melanoma. Em contrapartida, a atividade da catalase era menor nas células malignas. Foram mensurados também os níveis de antioxidantes lipossolúveis: vitamina E e ubiquinona; em melanomas, os níveis de vitamina E eram maiores e os de ubiquinona, menores. Foi realizada também a quantificação de ácidos graxos poli-insaturados e, interessante, as células de melanoma eram mais ricas deste tipo de lipídeo. Os autores discutem que esse perfil alterado do sistema redox de melanomas poderia tornar essas células mais susceptíveis aos efeitos de oxidantes. Em contrapartida, foi demonstrado que células de melanoma humano da

linhagem St-m12 liberaram mais  $O_2^{\cdot -}$  do que células polimorfonucleadas (sem ativação) e do que as células endoteliais da veia de cordão umbilical, HUVEC, enquanto a produção de  $H_2O_2$  extracelular era mínima (Bittinger, Gonzalez-Garcia *et al.*, 1998). Resultados semelhantes foram encontrados por Meyskens e colaboradores (2001). Os autores demonstraram que a produção intracelular de  $O_2^{\cdot -}$  em melanomas é cerca de 3 a 4 vezes maior do que em melanócitos; já a produção endógena de  $H_2O_2$  é até 43 % menor. Estes autores também observaram que, em células de melanoma, o fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B é constitutivamente ativo, correlacionando-se inversamente com os níveis de  $H_2O_2$ . Em conjunto, estes resultados podem sugerir que a maior expressão de SOD em melanomas seja uma resposta à maior produção endógena de  $O_2^{\cdot -}$ , enquanto que o principal destino do  $H_2O_2$  pode não ser a dismutação ou ainda que outros sistemas ou enzimas, que não a catalase, podem estar removendo eficientemente o  $H_2O_2$ .

Em um estudo onde se comparou a expressão gênica de um melanoma primário com a de um melanoma metastático (ensaio de microarranjo), observou-se uma maior expressão do gene da cadeia leve da ferritina no melanoma metastático (Baldi, Battista *et al.*, 2003). Este resultado foi comprovado posteriormente pelas técnicas de *northern-blot* e *western-blot* (Baldi, 2005). Ainda neste estudo, os autores diminuíram a expressão deste gene e observaram que as células de melanoma com a expressão da cadeia leve da ferritina suprimida tornavam-se mais susceptíveis ao tratamento com  $H_2O_2$  (houve indução de apoptose), tinham uma menor habilidade de formar um tumor xenográfico e apresentavam alterações no estado redox, com relação à linhagem parental (aumento da atividade da SOD, diminuição da atividade da catalase, aumento da concentração de vitamina E e aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS -, indicando maior peroxidação lipídica). Interessantemente, em outro estudo onde se utilizou o mesmo modelo celular, foi observado que a supressão da expressão da cadeia leve da ferritina diminuía a maturação da enzima tirosinase, o que resultava em menor pigmentação das células de melanoma (Maresca, Vittoria, Flori, Enrica *et al.*, 2006).

#### 2.5.1 Efeitos das melaninas no estado redox celular

Além da já comentada produção endógena de EROS durante a melanogênese (tópico 2.2.1), as melaninas possuem outros efeitos no estado redox

celular. Num estudo onde foram utilizadas melaninas sintéticas, demonstrou-se que ambos os tipos de melaninas reagem com radicais oxidantes e redutores, indicando que estas moléculas poderiam agir como *scavenger* de EROS no ambiente celular (Rozanowska, Sarna *et al.*, 1999). Utilizando lipossomos, Ezzahir (1989) mostrou que a eumelanina também possui papel inibitório sobre a lipoperoxidação induzida por luz visível.

Alguns estudos demonstraram um papel da melanina na proteção ou promoção de danos no DNA. Embora esta interação, a primeira vista, não seja relevante devido à compartimentalização da síntese de melanina dentro dos melanossomos, já foi demonstrado que nevos displásicos possuem melanossomos anormais, com estrutura rompida (Rhodes, Seki *et al.*, 1988; Borovansky, Mirejovsky *et al.*, 1991). Como resultado, ocorre vazamento dos intermediários da via de síntese da melanina, bem como das enzimas envolvidas neste processo (Jimbow, Lee *et al.*, 1993), o que pode resultar na proximidade entre melaninas e DNA. Esta possibilidade é reforçada pelo estudo de Hill e Hill (1987), onde foi demonstrada a quebra de fitas de DNA em células de melanoma murino incubadas com eumelanina, ao abrigo da luz.

Em um estudo utilizando como modelo amostras de pele humana com diferentes conteúdos de melanina, foi observado que as amostras de pele mais escuras foram as que apresentaram um maior fator de proteção contra a formação de radicais livres induzida por radiação UV (Herrling, Jung *et al.*, 2008). Usando um modelo semelhante, Tadokoro e colaboradores (2003) demonstraram que o conteúdo de melanina correlaciona-se inversamente com a quantidade de danos ao DNA (dímeros de ciclobutano de pirimidina e fotoprodutos 6-4) induzidos por radiação UVA/UVB. Dados interessantes também foram achados por Hoogduijn e colaboradores (2004). Neste trabalho, os autores mostraram que melanócitos humanos de origem caucasiana eram mais susceptíveis ao dano ao DNA causados por um agente químico, o  $H_2O_2$ , em relação à queratinócitos HaCaT. Quando os melanócitos eram estimulados a sintetizar melanina, tornavam-se mais resistentes ao tratamento com  $H_2O_2$ . Em conjunto, estes trabalhos sugerem que as melaninas possuem um papel citoprotetor contra agentes oxidantes, em especial, contra o dano ao DNA.

Controversamente, Kvam e Tyrrell (1999) relataram que a presença de eumelanina sintética aumentou a sensibilidade do DNA de timo de bezerro aos danos oxidativos induzidos pela radiação UVA, quando a 8-oxodGuo foi quantificada, sugerindo um papel fotossensibilizador da eumelanina. No mesmo estudo, os autores induziram a biossíntese de melanina em melanócitos humanos e os expuseram também à radiação UVA. Sob a condição de melanogênese aumentada, houve maior acúmulo de 8-oxodGuo no DNA após a irradiação, em relação às células controle. Corroborando com este estudo, foi descrito por Marrot e colaboradores (1999) que melanócitos humanos são mais susceptíveis do que os fibroblastos quanto à formação de quebra no DNA induzido por UVA (dano ao DNA avaliado pelo ensaio cometa). Quando a síntese de melanina foi induzida nos melanócitos, estas células se tornaram ainda mais susceptíveis à ação da radiação UVA, apresentando o DNA ainda mais fragmentado (Marrot, Belaidi *et al.*, 1999). É possível que parte destas lesões tenham sido ocasionadas por um efeito fotossensibilizador do DHICA, uma vez que já foi mostrado que queratinócitos incubados com este precursor de melanina desenvolvem mais quebras no DNA após exposição aos raios UVA do que aquelas que foram irradiadas na ausência do mesmo (Kipp e Young, 1999).

Com relação às propriedades da feomelanina, não há consenso sobre seu papel na biologia celular. Há evidências que a feomelanina seja um potente fotossensibilizador. Quando a feomelanina é irradiada (luz visível + UV), há geração de  $O_2^{\cdot-}$ , sendo que o efeito é mais pronunciado na região do UVB e UVC (Chedekel, Smith *et al.*, 1978; Chedekel, Agin *et al.*, 1980; Krol e Liebler, 1998). Em um modelo celular, foi observado que melanócitos primários que haviam sido estimulados a sintetizar melanina, resultando em uma alta relação entre feomelanina e eumelanina, eram mais susceptíveis ao desenvolvimento de quebra de fita simples de DNA, após exposição à irradiação UVA (Wenczl, Van Der Schans *et al.*, 1998). Em conjunto, estes estudos embasam a hipótese do papel fotossensibilizador deste pigmento.

Há também relatos de que a presença de melanina pode interferir na defesa antioxidante celular. Células expostas à irradiação UVA sofrem danos em suas enzimas antioxidantes, especialmente a catalase. Na presença de feomelanina exógena, este efeito é amplificado (Maresca, V., Flori, E. *et al.*, 2006). Além disso, já

foi relatado que a expressão da catalase em melanócitos é diretamente proporcional à quantidade de melanina total presente nestas células (Maresca, Flori *et al.*, 2008). Neste estudo, foi sugerido que ambas, catalase e melaninas, exercem um efeito sinérgico contra os danos oxidativos.

## 2.6 DANOS AO DNA

O DNA é susceptível à lesões por diferentes tipos de EROS, incluindo o  $\cdot\text{OH}$  e o  $^1\text{O}_2$ , mas não é atacado por  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , uma vez que este possui pouca ou nenhuma reatividade com nucleosídeos (Cadet e Treoule, 1978). O mecanismo pelo qual o DNA vai ser lesionado depende do tipo de EROS envolvido na reação. O  $\cdot\text{OH}$  é a EROS mais reativo e pode gerar uma gama de lesões. Por outro lado, o  $^1\text{O}_2$  é mais seletivo. Portanto, a identificação dos tipos de lesão encontradas no DNA fornece informações sobre a possível espécie envolvida na geração do dano.

Com relação aos tipos de danos causados pelo  $\cdot\text{OH}$  no DNA, podem ocorrer 2 tipos de reação: adição nas duplas-ligações das bases nitrogenadas ou abstração do hidrogênio do grupo metil da timina ou das ligações C – H da deoxirribose. As reações de rearranjo subsequentes à formação de radicais centrados no C ou no N podem dar origem a vários produtos (Evans, Dizdaroglu *et al.*, 2004), dependendo do mecanismo envolvido. Dentre as possíveis reações as quais os radicais das bases e da pentose podem sofrer, encontram-se a desidratação, a desaminação, a perda de um elétron, entre outros.

Devido ao seu caráter eletrofílico, o  $\cdot\text{OH}$  adiciona-se preferencialmente aos sítios da base nitrogenada com maior densidade de elétrons e isso varia de base para base. Por exemplo, no caso da citosina, 87 % das adições ocorrem no C5; já na timina, 60 % das adições ocorrem no C5, enquanto 30 % ocorrem em C6. A adição do  $\cdot\text{OH}$  em C5 da citosina pode gerar vários tipos de lesões, como o 5-hidroxiuracil, 5-hidroxicitosina e a 5-hidroxi-6-hidrouracil. Já quando o  $\cdot\text{OH}$  se adiciona no C5 da timina, obtém-se a timidina glicol (ThdGly) e a 5-hidroxi-6-hidrotimina (Evans, Dizdaroglu *et al.*, 2004).

A adição do  $\cdot\text{OH}$  nas bases também pode levar à quebra de fitas do DNA, ou seja, à quebra da ligação fosfodiéster do esqueleto do DNA. Para isso ocorrer, de modo geral, há necessidade de haver um segundo passo de reação sobre a base oxidada, podendo ser o tratamento com calor, álcalis ou tratamento enzimático. Os sítios abásicos (ou seja, aqueles em que houve eliminação da base, também chamados de sítios AP) podem ser revelados pelo tratamento com álcalis; o mais utilizado é o tratamento com 0,2 – 1 M de piperidina a 90 °C por 30 min. O tratamento com DNA glicosilases com atividade de endonuclease (por exemplo, a formamidopirimidina–DNA glicosilase e a endonuclease III) também pode revelar a presença de bases oxidadas, gerando quebra de fitas de DNA (os mecanismos serão discutidos na seção 2.6.2). Em casos minoritários, pode haver quebra direta (franca) do DNA, ou seja, a oxidação da nucleobase pode levar à quebra do DNA sem tratamento subsequente (Burrows e Muller, 1998).

O  $^1\text{O}_2$  também é reativo frente ao DNA e, devido à sua relevância neste trabalho, será discutido de forma mais detalhada separadamente, na seção a seguir.

#### 2.6.1 Danos ao DNA pelo $^1\text{O}_2$

Diferentemente do  $\cdot\text{OH}$ , o  $^1\text{O}_2$  é reativo frente às bases do DNA, mas não frente à pentose. Embora todas as bases do DNA sejam susceptíveis ao dano oxidativo pelo  $^1\text{O}_2$ , os dados da literatura mostram que a guanina é o principal alvo desta espécie (Cadet e Treoule, 1978; Ravanat, 2000; Ravanat, Saint-Pierre *et al.*, 2001). Uma das razões que levam a guanina a ser mais susceptível à ação do  $^1\text{O}_2$  é o seu menor potencial de oxidação, conforme mostrado na tabela 5.

	$E^{\circ}_{ox} (V)$
<b>GMP</b>	$1,07 \pm 0,02$
<b>AMP</b>	$1,18 \pm 0,02$
<b>TMP</b>	$1,21 \pm 0,03$
<b>CMP</b>	$1,26 \pm 0,02$

TABELA 5: POTENCIAL DE OXIDAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DE DNA.

FONTE: Fukuzumi, Miyao e colaboradores (2005)

NOTA: Valores referentes ao potencial de oxidação dos nucleotídeos avaliado em solução aquosa tamponada (Tris-HCl), pH = 7, 25 °C, contra um eletrodo calomelano saturado.

Outro dado que embasa o fato da guanina ser a principal base oxidada pelo  $^1O_2$  é a maior taxa de desativação total (*quenching* químico e físico) do  $^1O_2$  por um derivado de guanosina do que pelos derivados dos outros nucleosídeos. Neste estudo, foram usados os derivados lipofílicos da guanosina, adenosina e citidina e timidina, dissolvidos em solvente não aquoso, o 1,1,2-triclorotrifluoroetano, onde o tempo de vida do  $^1O_2$  é de aproximadamente 18 ms. Observou-se que a guanosina tem poder de *quencher* de  $^1O_2$  muito maior do que os demais nucleosídeos, numa razão G:A:C:T de 100:2:0,6:0,2 (Prat, Hou *et al.*, 1997), como pode ser observado na tabela 6.

Substrato	Nucleosídeo correlato	Taxa de desativação ( $M^{-1}s^{-1}$ )
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi) guanosina	Guanosina	$(3 \pm 0,2) \times 10^6$
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi) adenosina	Adenosina	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^4$
2',3',5'-tris(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi) citidina	Citidina	$(5,8 \pm 0,1) \times 10^4$
3',5'-bis(( <i>tert</i> -butildimetilsilil)oxi) timidina	Timidina	$(6,9 \pm 0,3) \times 10^3$

TABELA 6: TAXA DE DESATIVAÇÃO TOTAL DO  $^1O_2$  PELOS DERIVADOS DE NUCLEOSÍDEOS.

FONTE: Prat, Hou e colaboradores (1997)



Estudos conduzidos em DNA mostraram que o principal produto gerado pela oxidação pelo  $^1\text{O}_2$  é a 8-oxodGuo (Devasagayam, Steenken *et al.*, 1991; Ravanat e Cadet, 1995; Ravanat, Saint-Pierre *et al.*, 2001), embora também se observe a formação de quebra de fita simples de DNA (Schneider, Price *et al.*, 1990; Devasagayam, Di Mascio *et al.*, 1991; Devasagayam, Steenken *et al.*, 1991; Sies, 1993; Berra, Menck *et al.*, 2010).

Quando o nucleosídeo deoxiguanosina (livre) é usado como substrato, obtém-se, além de 8-oxodGuo, os 2 diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (dSp) e, minoritariamente, os 2 diastereoisômeros da 4-hidroxi-8-oxo-4,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (Ravanat, Martinez *et al.*, 2006).

É interessante notar que a 8-oxodGuo não é produto específico da oxidação por  $^1\text{O}_2$ , sendo também produto da ação do radical  $^{\bullet}\text{OH}$  gerado por radiação gama e pela reação de Fenton (Frelon, Douki *et al.*, 2002) e do peroxinitrito (Kennedy, Moore *et al.*, 1997). A 8-oxodGuo, por sua vez, é mais susceptível à oxidação do que a guanina (Sheu e Foote, 1995). A oxidação da 8-oxodGuo livre pelo  $^1\text{O}_2$  leva à geração de imidazolona, oxazolona e dos diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína (Martinez, Medeiros *et al.*, 2002). Quando a 8-oxodGuo foi incorporada em oligonucleotídeos, foi mostrado que o principal produto da oxidação da 8-oxodGuo pelo  $^1\text{O}_2$  é o ácido oxalúrico (Duarte, Gasparutto *et al.*, 2001).

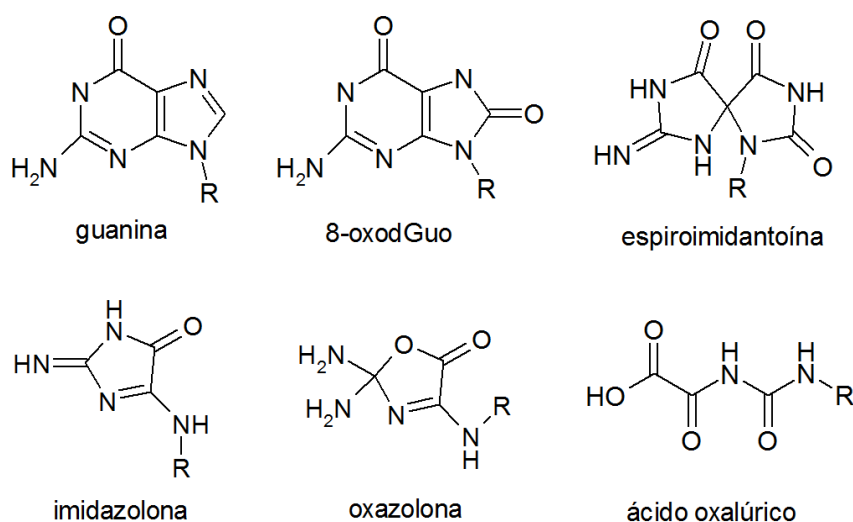


FIGURA 13: ESTRUTURA DA GUANINA E DE ALGUMAS LESÕES DERIVADAS DA GUANINA.

FONTE: Ravanat, Martinez e colaboradores (2004).

NOTA: R corresponde à 2'-deoxiribose.

Estudos utilizando modelos celulares corroboram os achados *in vitro*. Monócitos da linhagem THP1 tratados com o endoperóxido DHPNO<sub>2</sub> (o O<sub>2</sub> foi isotopicamente marcado neste estudo) apresentaram aumento significativo dos níveis de 8-oxodGuo no DNA (Ravanat, 2000). Em outro trabalho, observou-se níveis aumentados de 8-oxodGuo em fibroblastos e células de melanoma após a exposição à radiação UVA, uma fonte conhecida de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no meio celular (Kvam e Tyrrell, 1997). Embora as lesões espiroiminodihidantoína e ácido oxalúrico tenham sido encontrados nos estudos com nucleotídeos livres e em oligonucleotídeos, respectivamente, ainda não foram detectadas em sistemas celulares (Cadet, Ravanat *et al.*, 2006).

A formação de 8-oxodGuo no meio celular é de importância pois está relacionada à etiologia do câncer. Essa lesão tem um alto potencial mutagênico, uma vez que é capaz de parear com adenina levando a uma transversão G para T (Boiteux, Gajewski *et al.*, 1992; Michaels, Tchou *et al.*, 1992). De fato, já foi mostrado que, quando um DNA exógeno previamente tratado com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é inserido em células de mamíferos, ocorrem mutações neste DNA, principalmente pelo mecanismo de substituição de base (De Oliveira, Ribeiro *et al.*, 1992). Já quando plasmídeos e bacteriófagos são tratados com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, ocorre perda de função (Di Mascio, Wefers *et al.*, 1989). Estes achados fortalecem a importância biológica dos efeitos do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> sobre o DNA.

### 2.6.2 Reparo das lesões oxidativas no DNA

O sistema de reparo do DNA atua sobre lesões presentes no mesmo, evitando que ocorram mutações no código genético celular. Existem vários tipos de mecanismos envolvidos no reparo do DNA; para cada tipo de lesão, uma estratégia diferente é utilizada.

O mecanismo de reparo do tipo BER (reparo por excisão de base) é o mais relevante para lesões oxidativa em bases. O primeiro passo da via BER envolve o reconhecimento e a excisão das bases oxidadas por enzimas com atividade de DNA *N*-glicosilase. As enzimas *N*-glicosilases podem ser de dois tipos: monofuncionais ou bifuncionais. As *N*-glicosilases monofuncionais catalisam a hidrólise da ligação *N*-

glicosídica entre a 2'-desoxirribose e a base modificada, resultando, então, na liberação da base oxidada e na geração de um sítio abásico (AP) (exemplo de enzima: alquilpurina DNA *N*-glicosilase, AAG). Já as *N*-glicosilases bifuncionais, além de remover a base oxidada, também clivam os sítios AP por  $\beta$ -eliminação, isto é, pela eliminação do fosfato em 3' do sítio AP (atividade de AP liases), gerando uma quebra de fitas com uma lacuna (*gap*) de uma base contendo terminais 5'-fosfato e 3'-fosfo- $\alpha,\beta$ -aldeído insaturado (4-hidroxipentenal fosfato). São exemplos de *N*-glicosilases bifuncionais com atividade de  $\beta$ -liase: a timina glicol DNA glicosilase (NTH1), a OGG1 (8-oxoguanina DNA *N*-glicosilase) e a endonuclease III. Algumas *N*-glicosilases bifuncionais, como as enzimas NEIL1 e NEIL2, são capazes de clivar a ligação fosfodiéster em 3' e 5' ( $\beta,\delta$ -eliminação), ou seja, produz um *gap* de um único nucleotídeo, flanqueado por fosfatos em 3' e 5', conforme ilustrado na figura 14 (Altieri, Grillo *et al.*, 2008; Zharkov, 2008).

O passo subsequente depende de qual tipo de *N*-glicosilase atuou inicialmente. Caso tenha atuado a enzima *N*-glicosilase monofuncional, atuará sobre o DNA, a enzima APE1 (via dependente de APE1), que pode clivar o esqueleto do DNA imediatamente adjacente ao sítio abásico (atividade de AP endonuclease), gerando um terminal 3'-OH e 2-deoxirribose-5-fosfato (dRP) em 5'. A enzima APE1 atua também sobre o DNA que sofreu ação de *N*-glicosilases bifuncionais com atividade de  $\beta$ -liase. Neste caso, a APE1 realiza a excisão do 4-hidroxipentenal em 3', permitindo que o DNA sofra ação de POL $\beta$ , conforme ilustrado na figura 14 (Altieri, Grillo *et al.*, 2008). Entretanto, quando o DNA sofre ação de *N*-glicosilases bifuncionais com atividade de  $\beta,\delta$ -liases, a APE1 não é atuante (via independente de APE1). Como este tipo de *N*-glicosilase gera um sítio abásico flanqueado por fosfatos, é necessário que haja remoção do fosfato em 3', para que a DNA polimerase possa agir e, neste sentido, atuam as enzimas PNKs (polinucleotídeo quinase / fosfatase).

Subsequentemente, o DNA é reparado pela ação de DNA polimerases. Quando há ação da enzima DNA polimerase  $\beta$  (POL $\beta$ ), é caracterizada a "Via Curta" do mecanismo BER. Esta enzima incorpora o nucleotídeo correto e, quando necessário, remove o dRP em 5', por sua atividade de dRP liase. Após a ação da POL $\beta$ , há ligação do DNA pela ligase 3 (LIG3). A ligase LIG3 encontra-se associada

à XRCC1, proteína que estabiliza a atividade de LIG3 e de outras proteínas envolvidas no reparo do DNA. Por outro lado, o DNA também pode sofrer a ação das DNA polimerases normalmente envolvidas na replicação do DNA, POL $\delta$  ou POL $\epsilon$ , na presença dos cofatores RFC (fator de replicação C) e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), o que dá origem à chamada “Via Longa” do mecanismo BER. Neste caso, há incorporação de 2 a 10 nucleotídeos, sendo que a fita substituída é removida pela DNase IV ou pela FEN1 (flap endonuclease I) e a ligação das fitas é realizada pela DNA ligase 1 (LIG1), conforme ilustrado na figura 14 (Altieri, Grillo *et al.*, 2008; Zharkov, 2008).

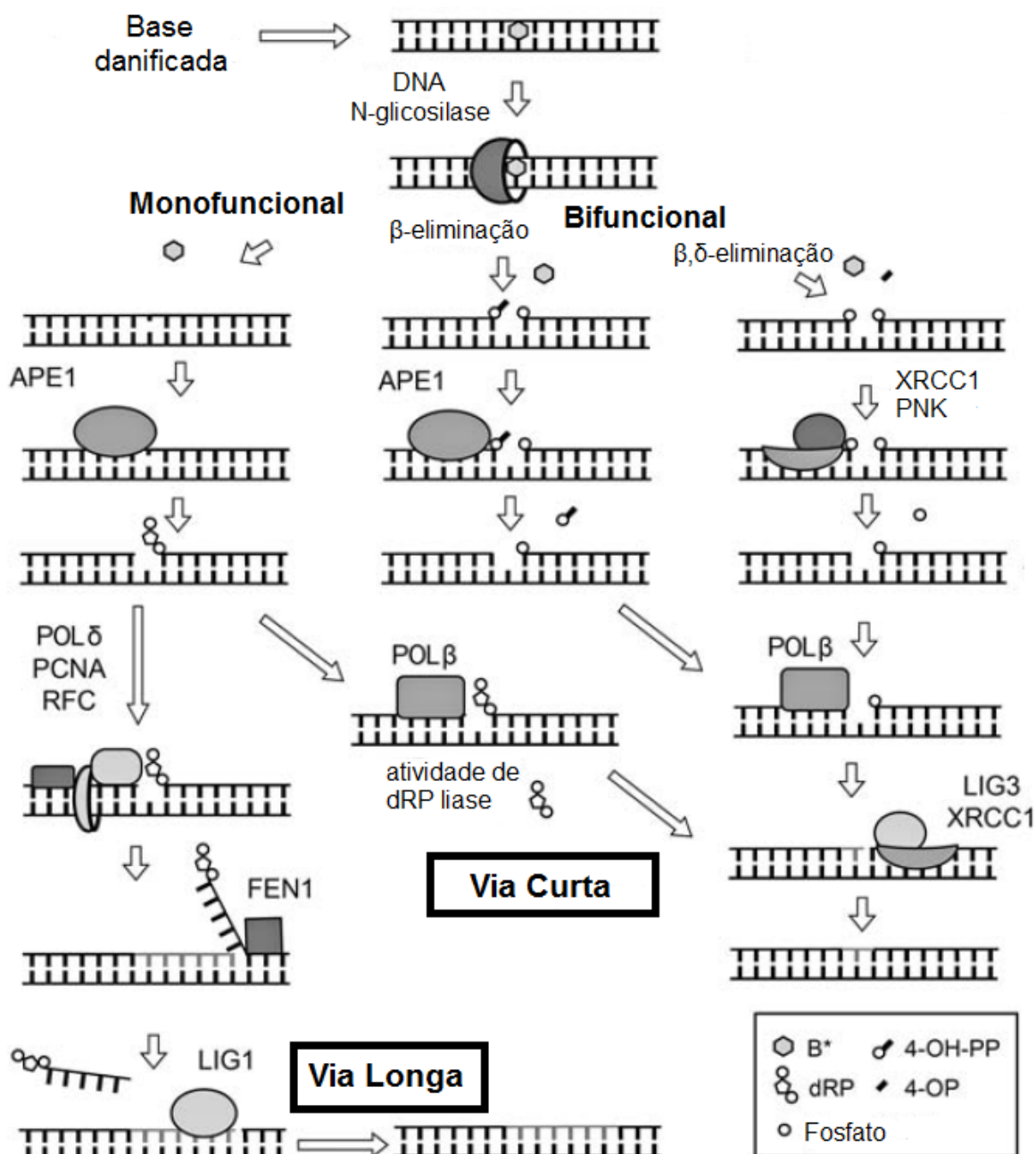


FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO DA VIA DE REPARO POR BER.

FONTE: Adaptado de Altieri e colaboradores (2008).

NOTAS: O mecanismo de reparo por BER envolve o reconhecimento e remoção da base danificada (B\*) por N-glicosilases. Os passos subsequentes dependem do tipo de N-glicosilase envolvida, podendo depender ou não de APE1. A enzima APE1 pode agir sobre sítios abásicos gerados por N-glicosilases monofuncionais, gerando uma hidroxila em 3' e uma 2-deoxirribose-5-fosfato (dRP), ou 4-OH-pentenal fosfatos (4-OH-PP) gerados por N-glicosilases com atividade de  $\beta$ -liases. Quando a N-glicosilase envolvida é bifuncional (atividade de  $\beta,\delta$ -liase), a APE1 não participa da via, pois a ação deste tipo de N-glicosilase libera 4-oxo-2-pentenal (4-OP), gerando terminais 3' fosfato, que são substratos para a PKN. Uma vez liberado o terminal fosfato em 3', as DNA polimerases podem iniciar a síntese para o reparo. A reposição do nucleotídeo pode ser realizada pela enzima POL $\beta$  e a ligação é realizada pelo complexo LIG3/XRCC1 (Via Curta da BER). A síntese também pode ser mediada por enzimas envolvidas na replicação do DNA (POL $\delta$  ou POL $\epsilon$ , RFC, PCNA) e, neste caso, a ligação é catalisada por LIG1 (Via Longa da BER).

Com relação ao reparo da principal lesão encontrada no DNA e principal produto da oxidação do DNA pelo  $^1\text{O}_2$ , a 8-oxodGuo, atuam as enzimas MutM bacteriana (também chamada de FPG) e a enzima OGG1 humana, ambas *N*-glicosilases que atuam no mecanismo já descrito via BER, onde a lesão é retirada no DNA e liberada no meio celular. Quando este mecanismo falha e o DNA sofre replicação, pode haver o pareamento errôneo da 8-oxodGuo com a adenina. Neste caso, a DNA glicosilase MutY bacteriana ou a MUTYH humana reconhecem o pareamento 8-oxodGuo – adenina, removem a adenina, substituem por citosina e permitem que esse pareamento errôneo seja reparado pela OGG1. Se nenhum desses mecanismos for atuante, em uma nova replicação, o par 8-oxodGuo – adenina pode ser substituído por timina – adenina, gerando, assim, uma mutação (David, O'shea *et al.*, 2007; Radak e Boldogh, 2010). Estes processos acima descritos encontram-se ilustrados na figura abaixo:

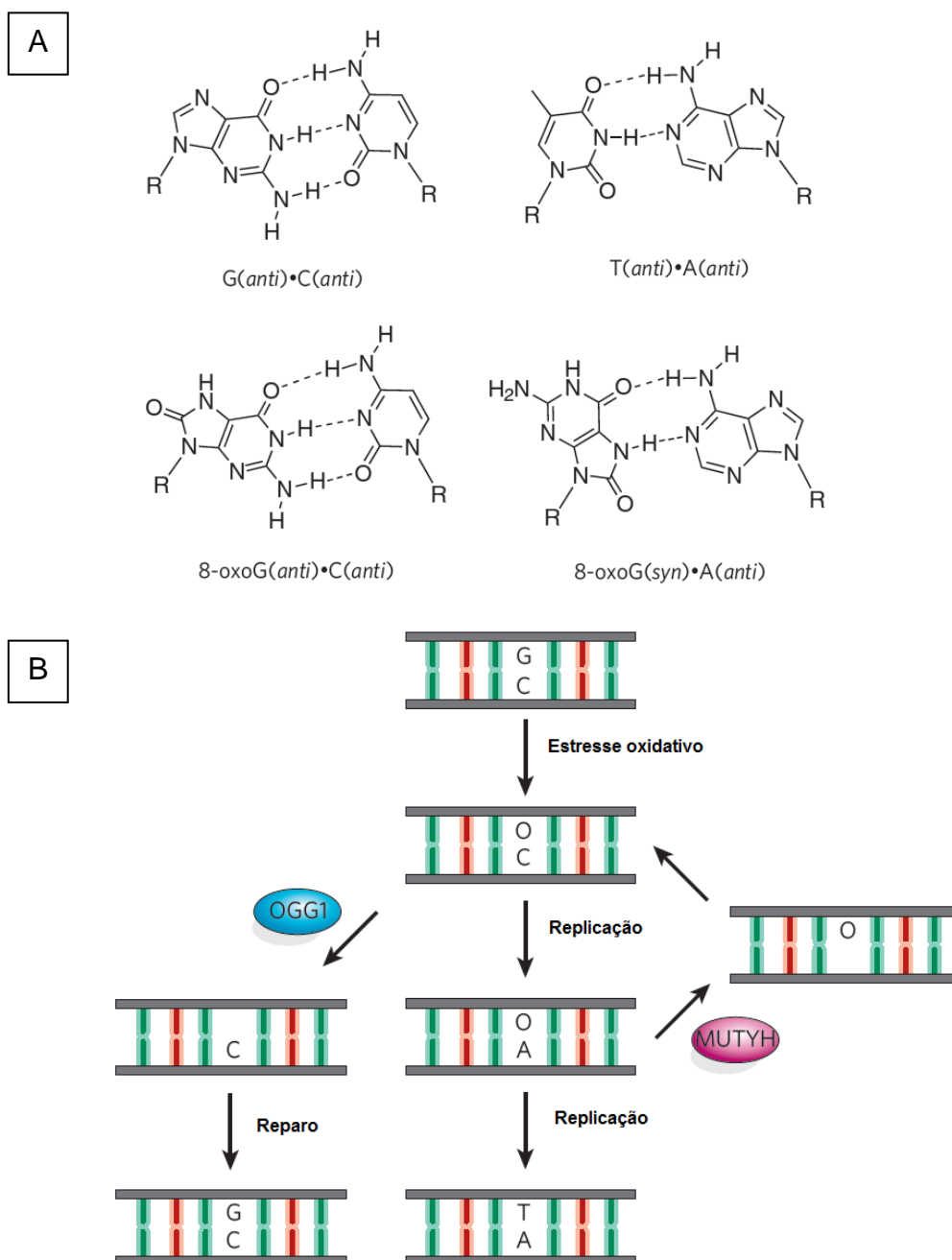


FIGURA 15: PAREAMENTOS POSSÍVEIS ENTRE AS BASES E MECANISMOS DE REPARO DA LESÃO 8-OXOdGUO.

FONTE: adaptado de David, O'shea e colaboradores (2007).

NOTA: (A) Comparação entre os pareamentos corretos (G – C e T- A) e os pareamentos possíveis com a 8-oxodGuo (8-oxodGuo – C e 8-oxodGuo –A). A 8-oxodGuo, na conformação *syn*, pode mimetizar uma timina e, durante a replicação, ser pareada erroneamente com uma adenina, levando a uma transverso G → T. (B) Os mecanismos envolvidos no reparo da 8-oxodGuo presente no DNA estão ilustrados. A guanina (G), quando oxidada, pode resultar em 8-oxodGuo (O), a qual pode ser reparada pela enzima OGG1 ou pode ser pareada erroneamente com uma adenina (A) durante a replicação. Esse pareamento errado pode ser reconhecido pela enzima MTH1, que remove a adenina e permite que o par 8-oxodGuo – citosina seja reconhecido pela OGG1. Caso isso não ocorra, em um próximo ciclo de replicação, pode haver mutação da sequência, onde o par G – C é substituído por um par T – A.

Existe também um mecanismo que evita que nucleotídeos oxidados (no *pool* de nucleotídeos) sejam incorporados ao DNA. Sobre a 8-oxodGTP, por exemplo, atua a enzima MTH1 humana (homóloga da MutT de *E. coli*) que, por sua atividade de fosfatase, hidrolisa este nucleotídeo à sua forma monofosfato (Altieri, Grillo *et al.*, 2008), impedindo, assim, que DNA polimerases utilizem este nucleotídeo modificado durante a replicação do DNA.

Existem alguns dados relacionando a atividade do sistema de reparo com o desenvolvimento, progressão e tratamento do melanoma. Análises de microarranjo demonstraram que enzimas envolvidas na via de reparo NER (reparo por excisão de nucleotídeo) e também a OGG1 são mais expressas em células de melanoma com maior capacidade de metástase (Kauffmann, Rosselli *et al.*, 2008). Entretanto, estes achados ainda são conflitantes com outros dados da literatura, uma vez que Gaddameedhi e colaboradores (2010) não encontraram nenhuma diferença quando compararam a atividade do sistema NER entre linhagens de melanoma e de melanócitos. Interessantemente, os melanócitos, quando comparados com fibroblastos, acumulam mais danos no DNA induzidos por radiação UVA, além de possuírem menor capacidade de reparo do DNA após exposição à radiação UVC ou tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wang, Choi *et al.*, 2010).

Tem-se investigado, ainda, a relação entre genes de enzimas de reparo e a susceptibilidade de desenvolver o melanoma. Recentemente, foi descoberto que um supressor de metástase, o NM23-H1, está envolvido no reparo de DNA, atuando, via NER, contra lesões geradas pela radiação UV. A deficiência desta proteína levou ao acúmulo de lesões no DNA, bem como aumento da mutagênese em células de melanoma humano. Já quando o gene foi superexpresso, houve uma diminuição da melanomagenese em camundongos expostos à radiação UVA/B (Jarrett, Novak *et al.*, 2012).

O sistema de reparo do DNA também pode servir como um mecanismo de resistência do melanoma frente às atuais drogas utilizadas na quimioterapia. Por exemplo, foi mostrado que a cisplatina, classicamente utilizada na terapia de muitos tipos de câncer por induzir ligações cruzadas entre as fitas de DNA, induz a expressão de enzimas de reparo de DNA em melanomas. Este pode ser o motivo da



refratariedade do melanoma contra esta droga, uma vez que a cisplatina tem pouca eficiência no tratamento desta neoplasia (Li e Melton, 2011).

Por outro lado, o sistema de reparo de DNA também pode servir como alvo terapêutico contra o melanoma. Foi observado que, quando foi realizada a deleção do gene da enzima de reparo *Ercc1*, houve aumento da sensibilidade das células de melanoma à cisplatina (Song, Ritchie *et al.*, 2011). De forma semelhante, a utilização de inibidores de APE1 aumentou a sensibilidade das células de melanoma à agentes alquilantes de DNA (Mohammed, Vyjayanti *et al.*, 2011).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A busca pela compreensão dos processos envolvidos tanto na etiologia do melanoma como dos mecanismos de resistência aos tratamentos atualmente empregados é de grande interesse, uma vez que esta neoplasia é altamente letal e sua incidência é crescente. Várias evidências apontam para a participação de 2 agentes em ambos os processos: melaninas e  $^1\text{O}_2$ . Em particular, a feomelanina parece ser relevante, uma vez que caracteriza o fenótipo caucasiano, o mais acometido pelo melanoma.

O dano ao DNA está envolvido no processo de carcinogênese, uma vez que alguns tipos de lesões podem resultar em mutações. Alguns estudos demonstraram que a presença de feomelanina aumentaria a formação de danos ao DNA após o tratamento com a radiação UVA, uma fonte de  $^1\text{O}_2$ . Embora este processo possa estar relacionado a um efeito fotossensibilizador da feomelanina, é possível que haja um efeito direto da mesma sobre o DNA, uma vez que esta interação é favorecida pela perda estrutural dos melanossomos durante a progressão do melanócito ao melanoma. Entretanto, até o momento, não havia informações sobre os efeitos da interação entre as melaninas e o DNA e, tampouco como o  $^1\text{O}_2$  poderia afetar este sistema. Embora já tenha sido relatada uma possível atividade *scavenger* das melaninas frente ao  $^1\text{O}_2$ , a relevância desta interação ainda permanecia desconhecida.

Apesar do processo da melanogênese ser relacionado à produção de EROS, ainda não havia sido caracterizada a capacidade antioxidante de células com diferentes conteúdos de feomelanina. Caso a presença da feomelanina levasse a alterações da expressão de enzimas antioxidantes ou dos níveis de antioxidantes solúveis, esta particularidade poderia resultar em diferentes graus de susceptibilidade frente a um agente oxidante, como o  $^1\text{O}_2$ . A este respeito, a resposta adaptativa após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  ainda é pouco conhecida e o entendimento deste processo poderia auxiliar no delineamento de terapias alternativas para o tratamento do melanoma.

Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram:

- Investigar o potencial das melaninas e do  $^1\text{O}_2$  de promover o dano ao DNA, utilizando como modelo experimental o DNA plasmidial;
- Investigar o potencial do  $^1\text{O}_2$  de modular os processos redox celulares de linhagens de melanoma humano que apresentem diferentes conteúdos de feomelanina.

Como objetivos específicos, encontraram-se:

A) No estudo do papel das melaninas e do  $^1\text{O}_2$  sobre o DNA, avaliar:

- A capacidade das melaninas de promover a quebra do DNA;
- O mecanismo pelo qual as melaninas levam à quebra do DNA;
- O efeito do  $^1\text{O}_2$  sobre a ação das melaninas promoverem quebra de DNA, utilizando dois modelos de geração de  $^1\text{O}_2$ : o DHPNO<sub>2</sub> e a irradiação visível;
- Os tipos de lesões oxidativas geradas pelas melaninas sobre o DNA (quantificação por HPLC/MS e utilização de enzimas de reparo de DNA);
- A interação entre o DNA e as melaninas.

B) No estudo da ação do  $^1\text{O}_2$  nos processos redox celulares em linhagens de melanoma produtoras ou não de feomelanina:

- Obter modelos celulares que diferissem na quantidade de feomelanina;
- Sintetizar o fotossensibilizador Rosa Bengala Acetilado;
- Construir e validar um aparato para irradiação das células;
- Avaliar a viabilidade celular após 0 ou 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , gerado por fotossensibilização;
- Quantificar os níveis celulares totais de glutathiona, imediatamente e após 18 h do tratamento com o  $^1\text{O}_2$ ;

- Avaliar a expressão gênica de enzimas envolvidas com a defesa antioxidante celular após 18 h do tratamento com  $^1\text{O}_2$ ;
- Avaliar os níveis basais de danos ao DNA, através do ensaio cometa;
- Avaliar dos níveis de danos ao DNA, 0 e 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  e relacionar com os níveis de expressão da enzima de reparo hOGG1;
- Avaliar a progressão do ciclo celular e a expressão de suas proteínas relacionadas após 18 h do tratamento com  $^1\text{O}_2$ .

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

A eumelanina sintética, tirosinase de cogumelo, D-manitol, deferoxamina, dimetilsulfóxido (DMSO), óxido de deutério, superóxido dismutase (SOD), catalase, ácido disulfônico de batocuproína dissódico, L-DOPA, resina quelante Chelex 100, sulfonato de batofenantrolina, ferritina de baço de cavalo, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). Azida de sódio, fosfato dibásico de sódio, azul de metileno (MB) e L-cisteína foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). As enzimas endonuclease III (EndoIII) e formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) foram compradas da New England Biolabs (Acton, MA). O Hoechst 33342 trihidroclorido foi adquirido da Invitrogen (Carlsbad, CA). O plasmídeo pUC18 foi comprado da Fermentas (Thermo Scientific). O metanol grau HPLC foi utilizado da JT-Baker (Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ). A agarose foi adquirida da Agargen (Brasil) e a solução de brometo de etídeo PlusOne™ foi adquirida da GE Healthcare-Amersham Biosciences (Reino Unido). A água ultrapura foi obtida por um sistema da GEHAKA (São Paulo, Brasil) e os diodos emissores de luz (LEDs) foram gentilmente doados pela empresa Cromatek - Cromax Eletrônica LTDA (São Paulo, Brasil). Os leitores de microplacas utilizados foram da marca Tecan Infinite® 2000 e Epoch™ Biotek; o HPLC, da marca Shimadzu e espectrômetro de massas do modelo microTOF Q-II (Bruker Daltonics).

### 4.2 SÍNTESE DA FEOMELANINA

A feomelanina foi sintetizada conforme descrito por Ito (1989). L-DOPA (1,0 mM) e L-cisteína (1,5 mM) foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,8. A mistura foi incubada a 25 °C por 4 h, sob borbulho de O<sub>2</sub>, após adição de 20 mg de tirosinase de cogumelo (2480 U.mg<sup>-1</sup>). Após incubação, a mistura foi acidificada a pH 3,0 com ácido acético e mantida a 4 °C por 1 h. O precipitado marrom foi coletado após lavagem com ácido acético 1 % (40 mL x 2) e, em seguida, com acetona (40 mL x 1). A secagem da feomelanina foi realizada em

dessecador e então equilibrada na presença de ar por 24 h. A síntese da feomelanina foi confirmada conforme descrito em 4.3.

### 4.3 CONFIRMAÇÃO DA SÍNTESE DA FEOMELANINA

Os métodos de detecção de melaninas, inclusive da feomelanina, se baseiam na degradação química do polímero e posterior análise de seus produtos de degradação, específicos para cada tipo de melanina. A hidrólise iodídrica da feomelanina gera 4-amino-3-hidroxifenilalanina (AHP) e 3-amino-4-hidroxifenilalanina (3-aminotirosina; AT) (Figura 16), que podem ser detectados por HPLC. As amostras de feomelanina foram incubadas com  $\text{H}_3\text{PO}_2$  30 % e ácido hidroídrico 57 %, por 16 h a 130 °C. Após este período, a amostra foi resfriada e o hidrolisado foi transferido para um tubo para secagem em concentrador aquecido (60 °C) a vácuo (Savant SpeedVac Plus SC210A), ressuspendido em HCl 0,1 M e filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ). Os produtos da hidrólise foram analisados por HPLC, utilizando-se uma coluna C18 (Luna C18, 250 x 4,6, Phenomenex) e detector eletroquímico. A fase móvel era constituída por tampão citrato de sódio 0,1 M (pH = 3,0), contendo octanosulfonato de sódio 1 mM e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  / metanol 0,1 mM, 96:2, e as corridas foram realizadas a 35 °C. Esta constituição da fase móvel permite distinguir os picos de AHP e AT (Kolb, Lentjes *et al.*, 1997). Para detecção, foi aplicado o potencial de 300 mV.

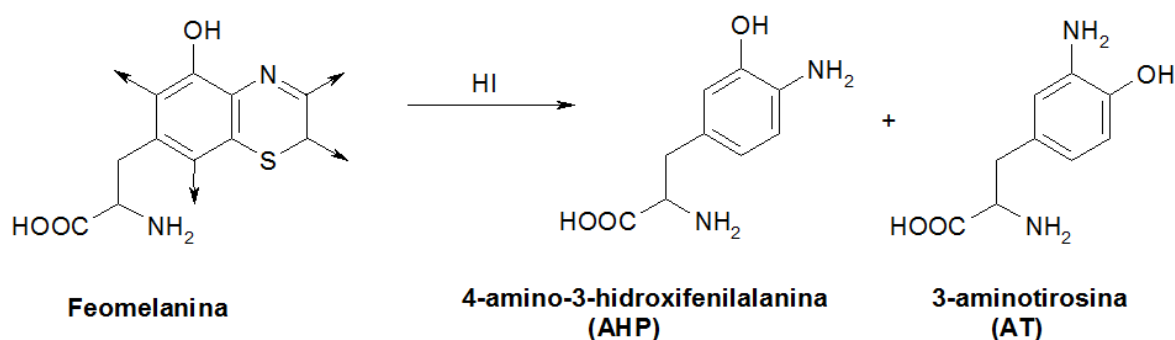


FIGURA 16: ESTRUTURAS DA 4-AMINO-4-HIDROXIFENILALANINA (AHP) E DA 3-AMINOTIROSINA (AT), PRODUTOS DA HIDRÓLISE IODÍDRICA DA FEOMELANINA.

FONTE: adaptado de Ito e Jimbow (1983)

#### 4.4 SÍNTESE DO DERIVADO DE NAFTALENO *N,N'*-DI(2,3-DIHIDROXIPROPIL)-1,4-NAFTALENODIPROPANAMIDO - DHPN

O derivado de naftaleno (*N,N'*-di(2,3-dihidroxiopropil)-1,4-naftalenodipropanamido - DHPN) utilizado como precursor do endoperóxido (DHPNO<sub>2</sub>) foi sintetizado conforme descrito anteriormente (Martinez, Ravanat *et al.*, 2000), numa colaboração com o Prof. Dr. Paolo Di Mascio (Instituto de Química, Universidade de São Paulo – São Paulo).

#### 4.5 SÍNTESE DO ENDOPERÓXIDO – DHPNO<sub>2</sub>.

Para síntese do endoperóxido do DHPN, o DHPNO<sub>2</sub>, foi utilizada a técnica de fotossensibilização, onde o azul de metileno foi empregado como fotossensibilizador. Por esta estratégia, o DHPN reage com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, gerando o DHPNO<sub>2</sub> (Figura 17). Duzentos miligramas de DHPN e 0,5 mg de azul de metileno foram dissolvidos em 2,5 mL de D<sub>2</sub>O. Essa mistura foi irradiada por uma lâmpada de tungstênio (500 W) a 4 °C, sob borbulho de oxigênio, até obtenção de um rendimento mínimo de 85 % de endoperóxido em relação ao total do derivado de naftaleno. O DHPNO<sub>2</sub> foi purificado utilizando uma resina de troca catiônica, Chelex 100 e filtrado (filtro com poro de 0,22 µm) para posterior armazenamento em nitrogênio líquido até o momento do uso. A concentração e o rendimento da síntese foram determinados por leitura espectrofotométrica em 288 nm. Nesta faixa de comprimento de onda, o derivado naftalênico DHPN tem máxima absorção ( $\epsilon_{\text{DHPN}} = 7780 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), enquanto o endoperóxido perde essa propriedade (Pierlot, Aubry *et al.*, 2000). Desta forma, a concentração do DHPNO<sub>2</sub> foi calculada pela diferença da absorbância da solução preparada e mantida em gelo até leitura e após aquecimento (1 h a 60 °C).

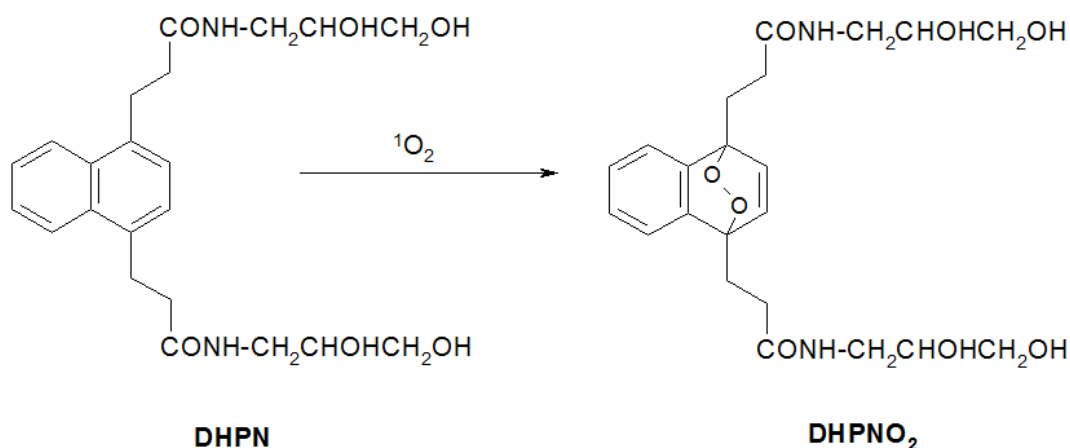


FIGURA 17: ESTRUTURAS DO DHPN E DHPNO<sub>2</sub>.

FONTE: adaptado de Martinez e colaboradores (2002).

NOTA: A reação entre o derivado de naftaleno, DHPN, com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, gera o endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>.

#### 4.6 SÍNTESE DO DHICA

O precursor de eumelanina DHICA foi sintetizado conforme descrito por Charkoudian e Franz (2006), numa parceria realizada com a Prof. Dra. Daniela de Luna Martins (Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro).

#### 4.7 ENSAIO DE QUEBRAS DE FITA DE DNA

Um modelo bastante utilizado para os ensaios *in vitro* de danos o DNA é o de quebras de fitas de DNA. Este ensaio baseia-se nas possíveis formas existentes de plasmídeos bacterianos dupla-fita. Quando intactos, os plasmídeos encontram-se majoritariamente na forma superenovelada. Se ocorrer quebra em uma das fitas, ocorre um relaxamento das fitas e o plasmídeo passa para a forma circular aberta. Se ocorrer quebra em ambas as fitas de DNA, obtém-se a forma linear, conforme ilustrado na figura 18 A. Essas 3 formas topológicas do plasmídeo migram diferentemente quando submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose, dando origem à bandas distintas que podem ser quantificadas por densitometria (Figura 18 B).



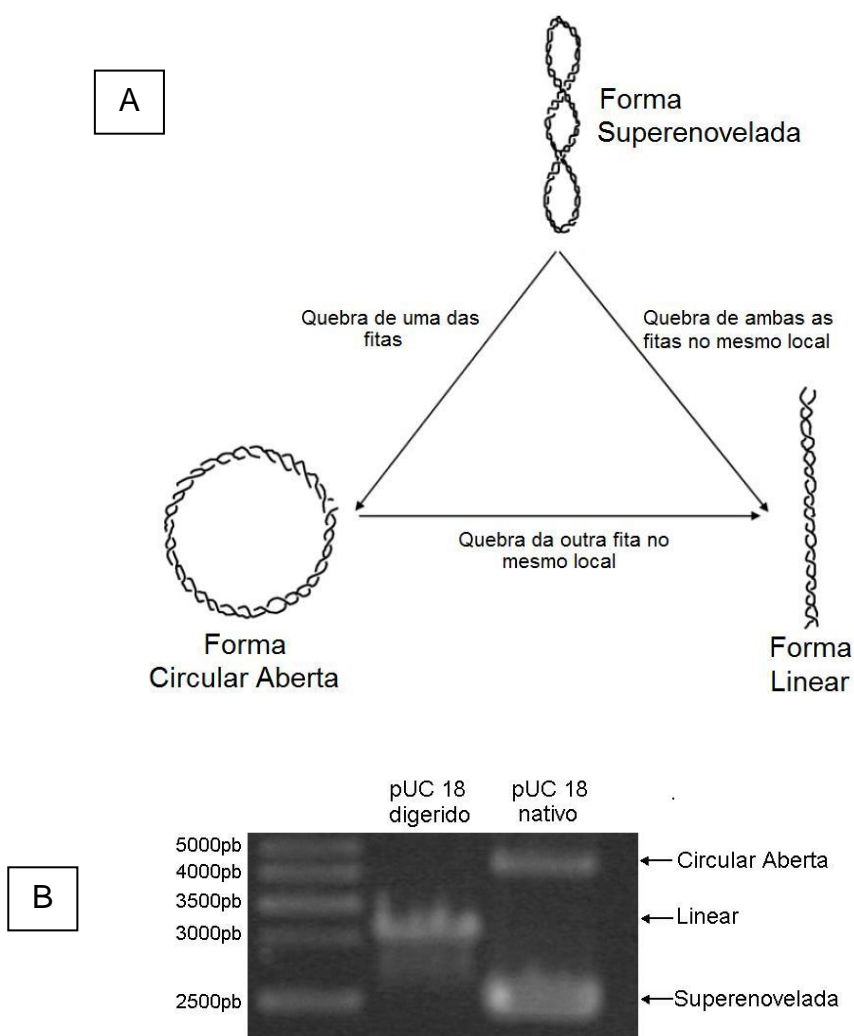


FIGURA 18: FORMAS TOPOLÓGICAS DE UM PLASMÍDEO E DIFERENÇAS NA SUA CORRIDA ELETROFORÉTICA.

FONTE: (A) adaptado de Yu, Geng e colaboradores (2007); (B) o autor (2012).

NOTA: (A) O DNA plasmidial intacto encontra-se em sua forma superenovelada. Ao sofrer quebra em uma das fitas de DNA, ocorre um relaxamento desta estrutura, resultando na forma circular aberta. Caso ocorra quebras em ambas as fitas, obtém-se a forma linear. (B) Diferenças na migração das formas superenovelada, circular aberta e linear em gel de agarose 1 %. O plasmídeo pUC18 foi digerido com a enzima de restrição BamHI, para dar origem à forma linear, que pode ser observada na segunda canaleta do gel.

Para o ensaio de quebra de fitas de DNA, os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) foram incubados na presença de  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de melaninas (feomelanina ou eumelanina) ou de  $\text{DHPNO}_2$  20 mM, por 2,5 h a  $37^\circ\text{C}$ , sob agitação constante, ao abrigo da luz. Como as melaninas foram solubilizadas em solução de hidróxido de sódio 1 M, foi utilizado ácido fosfórico 1 M para neutralizar o pH até 7 e, dessa forma, manter a solução tamponada. Para a investigação dos mecanismos envolvidos no dano ao DNA pelas melaninas, foram adicionados à reação:

batocuproína 20 mM, deferoxamina 20 mM, DMSO 20 mM, manitol 200 mM, azida sódica 200 mM, iodeto de potássio (KI) 10 mM, SOD 1.000 U.mL<sup>-1</sup> ou catalase 100 U.mL<sup>-1</sup>. Para investigação da ocorrência de bases oxidadas, foram utilizadas as enzimas FPG (formamidopirimidina DNA glicosilase, 8 U.mL<sup>-1</sup>) ou Endo III (endonuclease III, 10 U.mL<sup>-1</sup>), conforme recomendado pelo fabricante. A reação foi parada pela adição de FSUDS (tris HCl 65 mM, pH = 8.0, EDTA 1,75 mM, ficoll 10 %, SDS 1 %, azul de bromofenol 0,02 %) e congelamento a -20 °C. As amostras foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose 1 %, utilizando tampão TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH = 8), por 3 h a 45 V. Para visualização das bandas de DNA, foi utilizado o intercalante brometo de etídeo. As bandas foram analisadas por densitometria, através do programa ImageJ 1.43u (Wayne Rasband – National Institute of Health - USA). A porcentagem de quebras de fitas de DNA foi calculada pela quantidade relativa das formas linear (L), circular aberta (CA) e superenovelada (SE), utilizando a seguinte fórmula de correção, em decorrência da menor fluorescência da forma superenovelada em relação às demais (Epe e Hegler, 1994):

$$\% \text{ Quebras no DNA} = \left( \frac{\text{linear} + \text{circular aberta}}{1,4 \cdot (\text{superenovelada}) + \text{linear} + \text{circular aberta}} \right) \times 100$$

#### 4.8 DOSAGEM DE BASES DE DNA OXIDADAS

A quantificação das bases oxidadas no DNA plasmidial foi realizada como descrito por Frelon e colaboradores (2000), em colaboração com o Prof. Dr. Jean-Luc Ravanat (CEA – França). Resumidamente, os plasmídeos foram digeridos com nuclease P1 e subsequentemente tratados com fosfatases alcalinas. Em seguida, foram adicionados padrões internos às amostras e as mesmas foram analisadas por HPLC-MS/MS.

#### 4.9 ANÁLISE DA FEOMELANINA POR EPR

As análises de EPR (ressonância paramagnética eletrônica) foram realizadas em um instrumento da Bruker EMX a 77 K (banda X, 9.5 GHz, 20.31 mW, frequência de modulação: 100 kHz) pela Prof. Dra. Ana Maria da Costa Ferreira (Instituto de Química, Universidade de São Paulo – São Paulo).

#### 4.10 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DO FERRO DA FERRITINA

A liberação do ferro da ferritina de baço de cavalo ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi monitorada na presença das melaninas ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) pela medida do incremento da absorbância em 530 nm devido à formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -sulfonato de batofenantrolina, como descrito anteriormente (Oteiza, Kleinman *et al.*, 1995).

#### 4.11 FOTOSSENSIBILIZAÇÃO DAS MELANINAS

As melaninas ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em tampão fosfato, pH = 7) foram irradiadas por LEDs com pico de emissão em 526 nm, conforme gentilmente aferido pelo Prof. Dr. Evaldo Ribeiro (Departamento de Física – UFPR) e mostrado abaixo na figura 19:

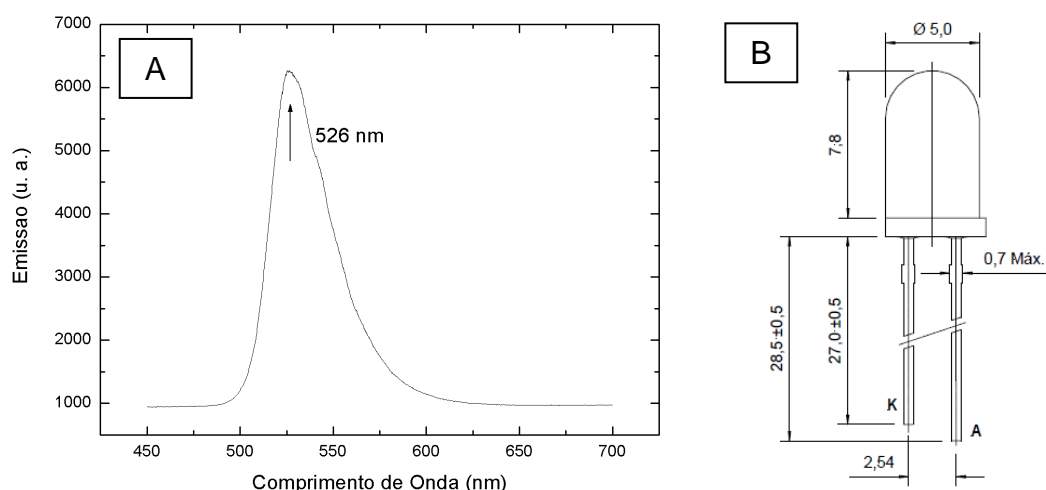


FIGURA 19: CARACTERÍSTICAS DOS LEDS UTILIZADOS NESTE TRABALHO.

FONTE: (A) o autor (2012); (B) Cromatek Cromax Eletrônicos LTDA.

NOTAS: (A) Gráfico do espectro de emissão de luz pelos LEDs utilizados neste trabalho. Observou-se um pico em 526 nm. *u.a.*: unidades arbitrárias. (B) Desenho esquemático das dimensões dos LEDs utilizados para irradiação das melaninas.

As melaninas ( $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram irradiadas por LEDs até obter uma dose final de 1,5 a  $9 \text{ J/cm}^2$ . Em seguida, os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados ao meio, e as amostras foram incubadas por 2,5 h, a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. Após adição de FSUDS, as amostras foram submetidas a uma corrida eletroforética em gel de agarose, conforme descrito em 4.7.

#### 4.12 ESPECTRO DAS MELANINAS APÓS REAÇÃO COM DHPNO<sub>2</sub>

O espectro de absorção das melaninas (400 µg.mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato, pH = 7) na região do visível foi realizada antes e depois de sua incubação na presença ou ausência de DHPNO<sub>2</sub> 20 mM, por 2,5 h, a 37 °C, ao abrigo da luz. As amostras foram mantidas em uma placa óptica Corning® e o espectro de absorção foi medido por um leitor de microplaca da marca Tecan (Infinite® Tecan microplate reader).

#### 4.13 REAÇÃO DO DHICA COM O DHPNO<sub>2</sub> E ANÁLISE POR HPLC E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O DHICA (100 µg.mL<sup>-1</sup>) foi incubado com DHPNO<sub>2</sub> 10 mM por 2,5 h a 37 °C, ao abrigo da luz e, então, analisado por HPLC (Shimadzu). Foi utilizada uma coluna Synergy™ Fusion (Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5 µm) e, como fase móvel, ácido fórmico 0,1 %, pH = 2,7:metanol 90:10 (fluxo de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>). A detecção foi realizada por um detector UV-VIS (254 nm). Na saída do detector UV, uma pequena fração da amostra foi direcionada para um espectrômetro de massas (microTOF Q-II - Bruker Daltonics, Billerica, Estados Unidos), a um fluxo de 100 µL.min<sup>-1</sup>. O espectro foi obtido no modo íon positivo. A temperatura da fonte foi mantida em 180 °C e o fluxo do gás secante foi de 6 L.min<sup>-1</sup>. O potencial do eletrodo capilar foi mantido em -4,5 kV.

#### 4.14 ENSAIO DE DESLOCAMENTO DO HOECHST 33342

A habilidade das melaninas se ligarem ao sulco menor do DNA foi avaliada pela observação da redução da fluorescência do corante Hoechst 33342. Primeiramente, o Hoechst 33342 (2 µM) foi misturado com 290 ng.mL<sup>-1</sup> de plasmídio em tampão fosfato. O espectro de emissão do corante foi obtido entre 370 a 600 nm, sob excitação em 343 nm. As melaninas foram adicionadas (8 a 80 µg.mL<sup>-1</sup>) e o espectro foi obtido novamente, para observar a ocorrência da redução da emissão de fluorescência nesta faixa do espectro.

#### 4.15 CULTIVO DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO SK-Mel 23, WM9, WM35 E 1205Lu

As células de melanoma humano da linhagem SK-Mel 23 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci (Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo). Estas células foram cultivadas na presença de meio RPMI, suplementado com 10 % SFB (para composição completa, ver em 4.16.1) e mantidas em estufa a 37 °C na presença de 5 % de CO<sub>2</sub>.

As linhagens de melanoma humano WM9, WM35 e 1205Lu pertencem a uma coleção de mais de 350 linhagens, chamada de série WM (*Wistar Melanoma*). As amostras dos pacientes foram coletadas e estabelecidas como linhagens (Hsu, Elder *et al.*, 2002) e gentilmente cedidas ao nosso grupo pelo Dr. Meenhard Herlyn do Instituto Wistar (Filadélfia, EUA). Estas células são cultivadas em meio *Tu*, cuja composição é detalhada em 4.16.1 e foram mantidas em estufa a 37 °C na presença de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Abaixo, na tabela 7, constam algumas informações sobre as linhagens WM9, WM35 e 1205Lu:

	Sexo / Idade do doador	Data de Isolamento	Local de Origem	Grau de agressividade
<b>WM9</b>	Masculino	03/08/78	Linfonodo da axila	Metastático
<b>WM35</b>	Feminino / 24	17/11/78	Pescoço	Radial / Vertical
<b>1205Lu</b>	Masculino / 37	n.a.	Metástase isolado de pulmão de camundongo	Metastático

TABELA 7: DADOS REFERENTES ÀS LINHAGENS CELULARES UTILIZADAS NESTE TRABALHO. FONTE: adaptado de Hsu, Elder e colaboradores (2002)

## 4.16 SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA O CULTIVO CELULAR

### 4.16.1 Meios de cultivo

O meio utilizado para o cultivo da linhagem SK-Mel 23 era consistido de meio RPMI (suplementado com 8 mM de bicarbonato de sódio e 20 mM de HEPES; pH = 7,4), 10 % de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O meio *Tu*, utilizado para cultivo celular das células das linhagens WM9, WM35 e 1205Lu, era constituído por meio MCDB 153 (suplementado com 8 mM de bicarbonato de sódio, pH = 7,4), 20 % de meio L-15 (pH = 7,4), 4 % SFB, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , insulina 5  $\text{ng.mL}^{-1}$  e gentamicina 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A esterilização de ambos os meios foi realizada pela filtração através de um filtro Millipore com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 4.16.2 Solução Salina Fosfato - Tamponada (PBS)

A solução salina fosfato tamponada (PBS) era constituída por NaCl 136  $\text{mmol.L}^{-1}$ , KCl 2,68  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,47  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH = 7,4. Para esterilização, a solução foi submetida à autoclavagem (45 min a 121 °C, 1 atm).

### 4.16.3 Solução Balanceada de Hanks (HBSS)

A solução balanceada de Hanks (HBSS) era constituída pela mistura das soluções A e B, as quais foram preparadas como soluções estoque (concentradas 20 x) e armazenadas a 4 °C. A solução A era composta por NaCl 2,73  $\text{mol.L}^{-1}$ , KCl 107  $\text{mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2$  25  $\text{mmol.L}^{-1}$  e  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$  27  $\text{mmol.L}^{-1}$ . A solução B era constituída por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,5  $\text{mmol.L}^{-1}$  e glicose 110  $\text{mmol.L}^{-1}$ . As duas soluções foram preparadas em água ultrapura, esterilizadas (solução A esterilizada por autoclavagem a 121 °C, 1 atm, 45 min; solução B esterilizada por filtração em filtro com 0,22  $\mu\text{m}$  de poro) e armazenadas a 4 °C. Para o uso, as soluções A e B foram misturadas (1:1), diluídas com água ultrapura estéril e o pH ajustado para 7,4.

#### 4.16.4 Solução de tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA era constituída por NaCl 137 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl 5,4 mmol.L<sup>-1</sup>, glucose 5 mmol.L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,42 mmol.L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mmol.L<sup>-1</sup>, NaHCO<sub>3</sub> 2,3 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,53 mmol.L<sup>-1</sup>, 50 mg % tripsina (1:250) e 2 mg % de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio. A solução foi esterilizada por filtração (poro de 0,22 µm) e armazenada a -20 °C até o momento do uso.

#### 4.17 ESTÍMULO DA FEOMELANOGÊNESE EM CÉLULAS DA LINHAGEM SK-Mel23

As células de melanoma da linhagem SK-Mel23 foram plaqueadas ( $3 \times 10^6$  células / placa) em placas de 147 cm<sup>2</sup> de área. Logo após o plaqueamento, as células foram tratadas com as diferentes combinações de tratamentos possíveis para indução de feomelanogênese (0,2 mM de tirosina; 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM DOPA, 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 10 mM NH<sub>4</sub>Cl + 0,2 mM tirosina; 10 mM NH<sub>4</sub>Cl + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM ácido kójico; 0,2 mM ácido kójico + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína). O meio de cultivo foi trocado todos os dias (sempre contendo o tratamento dissolvido em meio RPMI 10 % SFB) e, após 96 h, as células foram desaderidas com PBS suplementado com 2 mM de EDTA, lavadas 3 vezes com PBS (centrifugações a 2.000 rpm, 4 °C, 10 min) e o *pellet* foi congelado para posterior quantificação da feomelanina intracelular.

#### 4.18 PLAQUEAMENTO DAS CÉLULAS WM9, WM35 E 1205Lu PARA DOSAGEM DE FEOMELANINA

As células de melanoma humano foram plaqueadas em placas de 147 cm<sup>2</sup> e cultivadas até atingir 80 % de confluência. Neste momento, as células foram lavadas com PBS e removidas com rodinho (*cell scraper*). As células foram centrifugadas (2.000 rpm, 4 °C, 10 min) e ressuspensas em 10 mL de PBS. A quantidade de células foi avaliada pela contagem em câmara de Neubauer, para posterior

normalização dos dados. As células foram novamente centrifugadas e os *pellets* foram armazenados a -20 °C até o momento da análise.

#### 4.19 HIDRÓLISE IODÍDRICA PARA DOSAGEM DE FEOMELANINA CELULAR

O processamento das amostras celulares para dosagem de feomelanina foi baseada no método de Kolb e colaboradores (1997). Os *pellets* celulares foram homogeneizados com 100 µL de água ultra pura, vortexados e lisados por 3 ciclos de gelo / degelo (-196 °C em nitrogênio líquido / banho-maria 37 °C). O homogenato foi novamente vortexado e a ele foram adicionados 20 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>2</sub> 30 % e 500 µL de ácido iodídrico 57 %. Após 16 h de incubação a 130 °C, os lisados foram resfriados e evaporados a 60 °C, sob fluxo de nitrogênio (gasoso). O resíduo foi redissolvido em 1 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,05 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 4, e o pH foi ajustado para 4 com tampão bicina 1 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 13. Foi realizada uma purificação da amostra pela utilização de coluna preparativa SPE (ácido sulfônico aromático), da seguinte maneira: a coluna foi previamente equilibrada com 3 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,05 mol.L<sup>-1</sup>; a amostra foi aplicada; a coluna foi lavada com 2 mL de água ultrapura; e foi realizada eluição com KCl 0,3 mol.L<sup>-1</sup>, pH = 8,5. As amostras então foram congeladas (-80 °C) e liofilizadas. O sólido obtido foi ressuspenso com 200 µL de água ultrapura e as amostras foram filtradas em membrana de poro de 0,22 µm (do tipo PVDF).

#### 4.20 DOSAGEM DA FEOMELANINA POR HPLC

A quantificação dos produtos de hidrólise AHP e AT foi realizada em HPLC Shimadzu, conforme descrito por Wakamatsu e colaboradores (2002), com modificações. Foi utilizada uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm), acomodada em forno a 25 °C. A fase móvel era composta de tampão citrato de sódio 0,1 M, EDTA 0,1 mM, octanossulfonato 1 mM, pH = 5,7 : metanol, 99:1. O fluxo foi ajustado em 0,3 mL / min e foram injetados 20 µL de cada amostra por um equipamento de auto-injeção acoplado ao HPLC. O método de detecção utilizado foi o eletroquímico (Cela ESA modelo 5011A), com potencial ajustado em 300 mV e sensibilidade em 20 µA. Para quantificação da feomelanina, foi utilizada uma curva de calibração do padrão comercial de AT.



Para calcular a quantidade total de AHP, multiplicou-se os valores de concentração de AHP obtidos por 9, uma vez que o rendimento de AHP após a hidrólise da feomelanina é de 11 % (Wakamatsu, Ito *et al.*, 2002).

#### 4.21 DOSAGEM DE MELANINA TOTAL

Os níveis de melanina total foram avaliados conforme descrito por Kvam e Tyrrell (1999). As células foram plaqueadas ( $7,5 \times 10^5$  células a cada placa de  $22,1 \text{ cm}^2$ ) e cultivadas por 48 h. Após este período, o meio foi retirado e as células foram lavadas com 1 mL de PBS. Em seguida, adicionou-se 1 mL de PBS acrescido de 5 mM de EDTA e as células foram mantidas por 10 min em gelo, para desaderir. As células foram transferidas para microtubos e 50  $\mu\text{L}$  da suspensão foram armazenados para dosagem de proteínas (para normalização dos dados). As células então foram centrifugadas (10.000g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de NaOH 1 M. O lisado foi sonificado (em banho de ultrassom, por 15 min) e incubado *overnight*, a 37 °C, ao abrigo da luz. Finalmente, 100  $\mu\text{L}$  do lisado foram transferidos para placas de 96 poços e foi realizada leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas, em 470 nm. Para quantificação da melanina, foi utilizada uma curva-padrão de eumelanina, diluída em NaOH 1 M. Os dados foram expressos em microgramas de melanina por miligramas de proteína.

#### 4.22 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR APÓS O TRATAMENTO PARA O ESTÍMULO DA FEOMELANOGENESE

Para o ensaio de viabilidade após estímulo da melanogênese, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células SK-Mel23 / poço em placas de 96 poços. Em seguida, as células foram tratadas com 0,2 mM de tirosina; 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM DOPA, 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM tirosina; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM ácido kójico ou 0,2 mM ácido kójico + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína. O meio de cultivo foi trocado todos os dias (sempre contendo o tratamento diluído em meio RPMI 10 % SFB) e, após 96 h, a

viabilidade celular foi verificada pela utilização do método MTT. Para tanto, o meio de cultivo foi removido e foram adicionados às células 200  $\mu\text{L}$  de solução de MTT ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ , dissolvido em HBSS). Após 3 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. A absorbância da solução resultante foi determinada em 550 nm, em leitor de microplacas Tecan Infinite 2000. A viabilidade foi normalizada em relação à absorbância do grupo controle (100 % de viabilidade).

#### 4.23 SÍNTESE DO FOTOSSENSIBILIZADOR ROSA BENGALA ACETATO (RBAC)

A síntese do Rosa Bengala Acetato (RBAC) foi realizada conforme descrito anteriormente (Bottiroli, Croce *et al.*, 1997). Um grama de Rosa Bengala foi dissolvido em 50 mL de anidrido acético em um balão de fundo redondo equipado com um tubo de cloreto de cálcio. Neste momento, a coloração rosa era bastante intensa. Esta mistura foi incubada durante 20 h, sob constante agitação, em temperatura ambiente. Após esta incubação, observou-se um grande clareamento da amostra, dando um indício de que a síntese havia sido bem sucedida. A amostra foi tratada com solução aquosa de hidróxido de sódio 0,1 M e o RBAC foi extraído com acetato de etila. A fase orgânica e a fase intermediária de emulsão foram separadas da fase aquosa, secadas com sulfato de sódio e posteriormente rotaevaporadas. O sólido resultante foi exaustivamente lavado com etanol 95 %. Nesta etapa, os resíduos da forma não acetilada eram removidos na fase etanólica, enquanto o RBAC era recuperado por centrifugação. Após secagem do sólido em dessecador com cloreto de cálcio, obteve-se um pó de coloração branca.

#### 4.24 CÂMARA DE IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS PARA FOTOSSENSIBILIZAÇÃO

Para irradiação celular, foi construída uma caixa cúbica de fibra de média densidade (MDF), com dimensões internas de 22,5 cm. As paredes internas da caixa foram pintadas com *spray* preto fosco, para evitar reflexo da luz sobre a amostra. Para evitar interferência de radiação externa, a caixa também dispunha de uma tampa, com vedação total contra luz.

Atualmente, vários pesquisadores têm utilizado os LEDs (*light-emmitting diodes*) como fonte de irradiação na terapia fotodinâmica (Davids e Kleemann,

2010), inclusive quando o corante Rosa Bengala é empregado (Bottone, Soldani *et al.*, 2006; Soldani, Croce *et al.*, 2007; Panzarini, Tenuzzo *et al.*, 2009). A utilização dos LEDs é interessante porque sua emissão de luz está compreendida em uma banda espectral relativamente estreita, além de haver pouca dissipação de energia como calor (evitando aquecimento da amostra). Levando isso em consideração, foi construído um sistema de irradiação composto por LEDs alto brilho na cor *Verde Esmeralda Ultra Bright*, elípticos, de 5 mm de diâmetro, gentilmente doados pela empresa Cromatek (Cromax Eletrônica LTDA, São Paulo, Brasil). Estes LEDs possuem pico de emissão em 526 nm (para mais detalhes, veja o item 4.11). Como a luz emitida pelos LEDs é direcionada (o ângulo de emissão dos LEDs aqui utilizados é de 26°, conforme informado pela empresa Cromatek), foi utilizado um vidro texturizado do tipo *boreal* para obtenção de homogeneidade da luz irradiada sobre as células, conforme mostrado na figura 20.

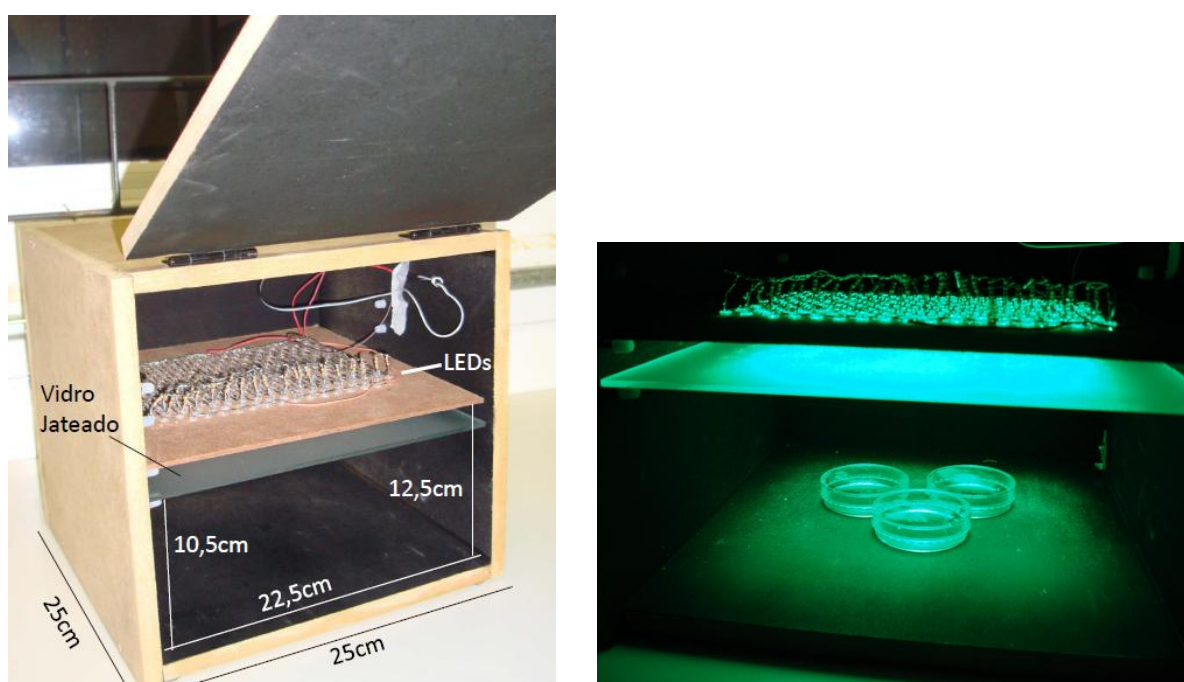


FIGURA 20: APARATO CONSTRUÍDO PARA IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTAS: (A) Esquema com as dimensões e disposição dos componentes utilizados no aparato usado para irradiação das células. (B) A utilização do vidro texturizado entre a fonte luminosa e as amostras levou à maior homogeneidade da luz incidida sobre as mesmas, sem, no entanto, que houvesse grande perda de potência da energia proveniente dos LEDs.

Utilizando 259 LEDs (Cromatek; código L221EGHU-15G3), uniformemente dispostos a uma distância de 1,1 cm entre os centros dos mesmos, foi obtida uma superfície de irradiação de 13 x 10 cm, com intensidade média de  $1,67 \pm 0,13$  mW/cm<sup>2</sup> (Figura 21), gentilmente aferido pelo Prof. Dr. Evaldo Ribeiro (Departamento de Física – UFPR). Para corrigir a diferença de intensidade de radiação sobre a superfície, as amostras sofreram um “rodízio” pela superfície de irradiação, ao longo do tempo de 15 minutos.

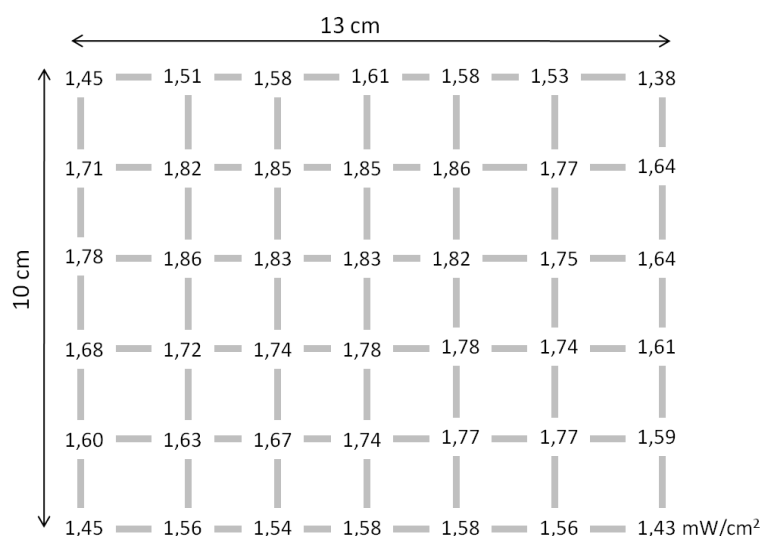


FIGURA 21: POTÊNCIA LUMINOSA (EM mW/cm<sup>2</sup>) EMITIDA NA SUPERFÍCIE INTERNA DA CÂMARA CONSTRUÍDA PARA A IRRADIAÇÃO CELULAR.

FONTE: o autor (2012).

#### 4.25 INTERNALIZAÇÃO DO RBAC PELAS CÉLULAS

Para verificar se o RBAC estava sendo internalizado e convertido a Rosa Bengala,  $2 \times 10^4$  células (linhagem WM9) foram plaqueadas em placas de 96 poços escura e incubadas por 24 h para adesão. Após este período, as células foram incubadas com 10, 25, 50 ou 75  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de RBAC (dissolvido em HBSS) por até 3,5 h. A cada 30 min, o HBSS foi removido e transferido para outra placa (para medida do efluxo de Rosa Bengala), enquanto as células foram lisadas com solução de triton X-100. A presença de Rosa Bengala, tanto no sobrenadante quanto no lisado celular, foi verificada pela medida do incremento da fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 540$  nm e  $\lambda_{\text{em}} = 570$  nm) em leitor de microplaca Tecan 2000.

#### 4.26 MEDIDA DA GERAÇÃO DE $^1\text{O}_2$

A medida da geração de  $^1\text{O}_2$  foi realizada conforme descrito por Haag, Hoiné e colaboradores (1984). Esta técnica se baseia na detecção do consumo do álcool furfurílico (FFA) e de seus produtos de reação com o  $^1\text{O}_2$ , pelo HPLC. Esta técnica tem como vantagem a alta solubilidade do FFA, o que permite que as medidas sejam realizadas em meio aquoso.

Para estimativa da quantidade de  $^1\text{O}_2$  que estava sendo produzida pelo sistema de fotossensibilização das células, 2 mM de FFA foram diluídos em PBS, na presença ou ausência de 1,89  $\mu\text{M}$  de Rosa Bengala (concentração equivalente à 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de RBAC). As amostras foram dispostas em placas de 24 poços e irradiadas de 0 a 60 min. Em seguida, 10  $\mu\text{L}$  das amostras foram injetados no HPLC.

Para a corrida cromatográfica, foi utilizada uma coluna C18, 250 x 2,1 mm, acondicionada em forno a 30 °C. A fase móvel era constituída por 50 % de metanol e 50 % de água e o fluxo foi ajustado para 0,2  $\text{mL.min}^{-1}$ . A detecção foi realizada em detector PDA na faixa do ultravioleta e a corrida cromatográfica foi acompanhada em 220 nm.

#### 4.27 VIABILIDADE CELULAR APÓS IRRADIAÇÃO

Para avaliação da viabilidade celular após tratamento das células com RBAC e exposição à irradiação, foram utilizados dois métodos distintos: o do MTT e o do cristal violeta, conforme descrito abaixo:

##### 4.27.1 Método do MTT

O método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazil-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) baseia-se no princípio de que apenas células vivas são capazes de reduzir o MTT pelas desidrogenases mitocondriais, gerando um produto violáceo, o formazan, que pode ser avaliado em espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

As células ( $2 \times 10^4$  células / poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão. Após este período, o meio de cultivo foi removido e substituído pela solução de RBAC nas doses de 1 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , dissolvido em meio de cultivo. As células foram mantidas na presença do RBAC por 2 h, a 37 °C,

ao abrigo da luz, para internalização do corante, conforme descrito anteriormente. Em seguida, a solução de RBAC foi removida, substituída por solução de HBSS e as células foram irradiadas por 15 min, totalizando uma dose de irradiação de  $1,5 \text{ J/cm}^2$ . Os respectivos controles sofreram o mesmo processo, entretanto, foram mantidos o tempo todo ao abrigo da luz. Para avaliação da viabilidade celular imediatamente após o término do tratamento, o HBSS foi removido e o ensaio do MTT foi realizado em seguida. Já para avaliação da viabilidade celular 18 h após a irradiação, o HBSS foi substituído por meio de cultivo e as células foram mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$ , a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz por 18 h.

Para realização do método MTT, foram adicionados às células 200  $\mu\text{L}$  de solução de MTT ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Após 3 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ , o sobrenadante foi retirado e os cristais de formazan foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de DMSO. A absorbância da solução resultante foi determinada em 550 nm, em leitor de microplacas Tecan Infinite 2000. A viabilidade foi normalizada em relação à absorbância do grupo controle “escuro” (100 % de viabilidade).

#### 4.27.2 Método do Cristal Violeta

O método do cristal violeta é baseado no fato de que apenas as células viáveis permanecem aderidas à superfície de cultivo (Kueng, Silber *et al.*, 1989). Assim, após fixação das células, é adicionado o corante cristal violeta que, por sua vez, se liga ao DNA. O corante então é eluído e a viabilidade celular é avaliada por leitura espectrofotométrica.

As células ( $2 \times 10^4$  células / poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h para adesão. Após este período, o meio de cultivo foi removido e substituído pela solução de RBAC nas doses de 1 a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , dissolvido em meio de cultivo. As células foram mantidas na presença do RBAC por 2 h, a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz, para internalização do corante, conforme descrito anteriormente. Em seguida, a solução de RBAC foi removida, substituída por solução de HBSS e as células foram irradiadas por 15 min, totalizando uma dose de irradiação de  $1,5 \text{ J/cm}^2$ . Os respectivos controles sofreram o mesmo processo, entretanto, foram mantidos o tempo todo ao abrigo da luz. Para avaliação da viabilidade celular imediatamente após o término do tratamento, o HBSS foi removido e o ensaio do

Cristal Violeta foi realizado em seguida. Já para avaliação da viabilidade celular 18 h após a irradiação, o HBSS foi substituído por meio de cultivo e as células foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub>, a 37 °C, ao abrigo da luz por 18 h.

Para realização do ensaio do cristal violeta, as células foram lavadas com PBS, e posteriormente fixadas com metanol 100 % durante 10 minutos. Após este tempo, o metanol foi retirado e adicionou-se a solução de cristal violeta 0,2 % diluída em etanol 2 % durante 3 minutos. Em seguida, a solução de cristal violeta foi retirada e foram realizadas lavagens sucessivas com PBS para a remoção do excesso de corante. O cristal violeta foi eluído com solução de citrato de sódio 0,05 mol.L<sup>-1</sup> em etanol 50 %. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas Tecan Infinite 2000 em 540 nm. A viabilidade foi normalizada em relação à absorbância do grupo controle “escuro” (100 % de viabilidade).

#### 4.28 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR

Para avaliação do ciclo celular, as células foram plaqueadas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> de área (7,5 x 10<sup>5</sup> células / placa) e mantidas em estufa Sanyo com atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C por 24 h para adesão. Após este período, o meio foi retirado e substituído por 2 mL de RBAC 2 µg.mL<sup>-1</sup> dissolvido em meio de cultivo. As células foram incubadas por 2 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz, para internalização do fotossensibilizador. Em seguida, o meio foi substituído por 2 mL de HBSS e as células foram irradiadas por 15 min (dose final: 1,5 J/cm<sup>2</sup>). Os respectivos controles, não irradiados, foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto pela exposição à luz (mantidos no escuro). A solução de HBSS foi removida e foram adicionados 3 mL de meio de cultivo. As células foram mantidas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> por 18 h. Após este período, o sobrenadante foi coletado em tubos *falcon* de 15 mL, as células aderidas foram lavadas com 1 mL de PBS e 300 µL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados. Após soltura das células, foi adicionado 1 mL de solução de SFB 10 % em PBS e as células foram centrifugadas a 500 g (centrífuga *Eppendorf* 5810R) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* celular foi lavado com 1 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1,2 mL de PBS e foram adicionados 3 mL de etanol a 4 °C, gota a gota, sob agitação leve e constante,

para fixação. As células foram mantidas em geladeira (4 °C) ao abrigo da luz por até 1 semana.

No dia da análise, foram adicionados 8 mL de PBS gelado à suspensão celular e as células foram centrifugadas a 1.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS e foram transferidas para microtubos de 2 mL. Após centrifugação (1.000 g, 10 min, 4 °C), o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 300 µL de solução de iodeto de propídeo – PI (PI 50 µg.mL<sup>-1</sup>, triton X-100 1 % em PBS, RNase A 10 µg.mL<sup>-1</sup>). Após 30 min de incubação à temperatura ambiente (ao abrigo da luz), as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur (BD). Foram adquiridos 10.000 eventos, usando como filtro de fluorescência FL2. As análises foram realizadas usando um histograma (eixo X: filtro FL2, eixo Y: números de eventos) pelo *software* WinMDI version 2.9 (desenvolvido por Joseph Trotter, disponível na Web).

#### 4.29 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL

Para avaliação da expressão gênica, foram analisados os níveis de RNA mensageiro (mRNA) através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para isso, as células foram plaqueadas em placas de 22,1 cm<sup>2</sup> de área (7,5 x 10<sup>5</sup> células / placa) e mantidas em estufa Sanyo com atmosfera de CO<sub>2</sub> (5 %) a 37 °C por 24 h para adesão. Após este período, o meio foi retirado e substituído por 2 mL de RBAC 2 µg.mL<sup>-1</sup> dissolvido em meio de cultivo. As células foram incubadas por 2 h a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, ao abrigo da luz, para internalização do fotossensibilizador. Em seguida, o meio foi substituído por 2 mL de HBSS e as células foram irradiadas por 15 min (dose final: 1,5 J/cm<sup>2</sup>). Os respectivos controles, não irradiados, foram submetidos ao mesmo procedimento, exceto pela exposição à luz (mantidos no escuro). A solução de HBSS foi removida e foram adicionados 3 mL de meio de cultivo. As células foram mantidas a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> por 18 h. Após este período, o sobrenadante foi removido, as células aderidas foram lavadas com 1 mL de PBS e 300 µL de solução de tripsina-EDTA foram adicionados. Após soltura das células, foi adicionado 1 mL de solução de SFB 10 % em PBS, a suspensão celular foi transferida para microtubos de 2 mL e as células foram centrifugadas a



500 g (centrífuga *Eppendorf* 5810R) por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* celular foi lavado com 1 mL de PBS e as células foram novamente centrifugadas. Finalmente, o sobrenadante foi novamente removido e o *pellet* celular foi armazenado em freezer -80 °C até o dia da extração do mRNA.

Para quantificação dos níveis de mRNA, foram realizados a extração do mRNA, síntese do cDNA e o RT-qPCR, conforme descrito nos itens subsequentes.

#### 4.29.1 Extração do mRNA

Para extração do mRNA, foi utilizado o *kit* comercial *RNeasy Mini* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O rendimento e pureza da extração foram verificados pela quantificação de ácido nucléicos através do aparelho Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). A presença de DNA genômico ou de RNA degradado foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 1 %, em tampão TBE (35 V, 400 mA, 3,5 h) e visualização pela coloração com brometo de etídeo. Após confirmação da boa qualidade do mRNA extraído, as etapas subsequentes foram realizadas.

#### 4.29.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA a partir do mRNA foi realizada através do *kit* comercial *ImProm II Reverse Transcription System* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. Este *kit* baseia-se na atividade da transcriptase reversa sobre o mRNA com cauda poliA.

Para a síntese do cDNA, 1 µg de RNA (em 6,5 µL) foi adicionado a 1 µL de DNase I (Promega), 1 µL de tampão para DNase I (Promega) e 0,5 µL do inibidor de RNase RNase Out (Invitrogen). Essa mistura foi incubada por 37 °C por 10 min e, em seguida, a 75 °C por 5 min. Após isso, adicionou-se 1 µL de oligo dT em cada amostra e incubou-se por mais 5 min a 70 °C. As amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 min e centrifugadas a 10.000 g por 1 min. Finalmente, foram adicionados 4 µL de tampão para transcriptase reversa 5x, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL da mistura de dNTP 10 mM, 0,5 µL de água, 1 µL da enzima transcriptase reversa e 0,5 µL de RNasin (Promega) às amostras. As amostras foram incubadas por 5 min 25 °C e, em seguida, por 1 h a 42 °C. A transcriptase reversa foi inativada por

temperatura (15 min a 70 °C) e, ao final, foram adicionados 40 µL de água livre de RNase.

#### 4.29.3 RT-qPCR

A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Corbett Research) utilizando os reagentes do *Rotor-Gene SYBR Green PCR kit* (Qiagen). A mistura de reação teve um volume final de 18 µL, sendo constituída por: 4,5 µL de cDNA 1:30 (em água); 4,5 µL do par de iniciadores F (*forward*) e R (*reverse*), cujas sequências são mostradas na tabela 8; e 9 µL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix* (composto pela HotStarTaq Plus DNA polimerase; tampão da polimerase; mistura de dNTPs e água livre de RNase). Para realização das reações, as amostras foram incubadas a 95 °C durante 5 minutos. Em seguida, foram realizados 45 ciclos de amplificação para cada gene testado, sendo que as amostras ficaram 10 segundos a 95 °C e 20 segundos a 60 °C em cada ciclo. A curva de dissociação foi verificada variando-se a temperatura de 60 °C a 90 °C. Os valores de CT dos genes alvo foram representados como unidades relativas de expressão, normalizados por genes de controle interno *hHMBS* (hidroximetilbilano sintase) e *hHPRT* (hipoxantina fosforibosiltransferase). Esta normalização foi realizada pelo software geNorm 3.4 (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002).

Gene	Concentração (nmol.L <sup>-1</sup> )	Sequência (F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i> )
<b>SOD 1 (CuZnSOD)</b>	200	F: 5'-GTGCAGGGCATCATCAATTTC-3' R: 5'-AATCCATGCAQGCCTTCAGT - 3'
<b>SOD 2 (MnSOD)</b>	150	F: 5'-GGACACTTACAAATTGCTGCTTGT-3' R: 5'-AGTAAGCGTGCTCCCACACAT-3'
<b>Catalase</b>	150	F: 5'-GATAGCCTTCGACCCAAGCA-3' R: 5'-ATGGCGGTGAGTGTCAGGAT-3'
<b>GPx</b>	150	F: 5'-TGCTGGCCTCCCCTTACAG-3' R: 5'-GCACACATGGCGCAATTG-3'
<b>GRed</b>	200	F: 5'-GTGGCACTTGCGTGAATGTT-3' R: 5'-GGAAAGCCATAATCAGCATGATC-3'
<b>hOGG1</b>	150	F: 5'-ATGGTGGAGCGGCTGTGCCA-3' R: 5' – ATAGCCCAGGCCAGCTTCCT-3'
<b>Prdx1</b>	150	F: 5'-TGGCCGCTCTGTGGATGAGACTTT-3' R: 5'-CAGGCTTGATGGTATCACTGCCAGGTT-3'
<b><math>\gamma</math>-glutamilcisteína ligase</b>	200	F: 5'-AGCAATAAACAAGCACCCCTCG-3' R: 5'-TGACAACCTTTTCTCCTCTCCTAT-3'
<b>p16</b>	150	F: 5'-CAGTAACCATGCCCGCATAG-3' R: 5'-CTGTAGGACCTTCGGTGA-3'
<b>p14/ARF</b>	150	F: 5'-CTGCAGGTCATGATGTTTGGC-3' R: 5'-CGTCATGGACTGGACTGGTAC-3'
<b>p21</b>	200	F: 5'-ACTCTCAGGGTCGAAAACGG-3' R: 5'-GATTAGGGCTTCCTCTTGGAGA-3'
<b>p53</b>	200	F: 5'-TGGTAATCTACTGGGACGGA-3' R: 5'-TTGCGGAGATTCTCTTCCTCT-3'
<b>hHMBS</b>	150	F: 5'-TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT-3' R: 5'-CAACAGCATCATGAGGGTTTTC-3'
<b>hHPRT</b>	150	F: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' R: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

TABELA 8: CONCENTRAÇÃO E SEQUÊNCIA DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NA TÉCNICA DO RT-qPCR.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Abreviaturas: SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; GRed: glutathione reductase; hOGG1: 8-hidroxiguanina DNA-glicosilase humana; Prdx1: peroxiredoxina 1; hHMBS: hidroximetilbilano sintase; hHPRT: hipoxantina fosforibosiltransferase.

#### 4.30 QUANTIFICAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL CELULAR (GSx)

Os níveis de glutatona total foram analisados pela técnica adaptada de Tietze (1969). As células foram plaqueadas, tratadas, coletadas e armazenadas da mesma maneira como descrito no item 4.29. No dia da análise, as células foram lisadas pela adição de 1 mL de água ultrapura e sonicação em sonicador da Sonics & Materials INC, modelo VC 501 (3 x 20 s, amplitude: 20, 20 kHz, em banho de gelo). Em seguida, os *debris* celulares foram removidos por centrifugação (10.000 g, 10 min, 4 °C). Cinquenta microlitros do sobrenadante foram separados para posterior dosagem de proteínas (conforme descrito em 4.31), para normalização dos dados. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de ácido sulfosalicílico 50 % à 380 µL do sobrenadante, para precipitação de proteínas. A mistura foi mantida por 5 min em banho de gelo e, em seguida, centrifugou-se novamente (10.000 g, 10 min, 4 °C). O pH das amostras foi ajustado para 7 pelo uso de trietilonamina 1 M (cerca de 15 µL por amostra).

A dosagem da GSx foi realizada em placas de 96 poços. Para cada amostra, o meio de reação era constituído por: 20 µL do lisado celular, 50 µL de NADPH 0,4 mg.mL<sup>-1</sup>, 30 µL de água e 100 µL de DTNB 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> + 2 U.mL<sup>-1</sup> de glutatona redutase, dissolvidos em tampão fosfato 0,1 M, 5 mM de EDTA, pH = 7,5. A cinética da reação foi acompanhada por 10 min (com intervalos de 1 min entre as leituras) a 37 °C, em leitor de microplacas Tecan Infinite 2000, em 412 nm.

A concentração de GSx em cada amostra foi calculada pela comparação dos dados da cinética com uma curva-padrão de glutatona, seguida pela normalização dos dados pela concentração de proteína de cada amostra.

#### 4.31 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

Para dosagem de proteínas, foi utilizado o método de Bradford (1976). O reativo de Bradford era constituído por 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,75 % de etanol e 8,5 % de ácido fosfórico. Após dissolução total do Coomassie, o reagente foi filtrado (filtro Whatman número 1) antes de ser utilizado.

A dosagem de proteínas foi realizada em microplacas de 96 poços. Cinco microlitros da amostra foram adicionados a 250 µL do reagente de Bradford. Após

10 min, realizou-se leitura espectrofotométrica em 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada com base na utilização de uma curva-padrão de albumina sérica bovina (BSA).

#### 4.32 ENSAIO COMETA

Os danos ao DNA foram avaliados pelo ensaio cometa. Para tanto, foram utilizadas as seguintes soluções:

- **Solução de lise (estoque):** A solução de lise (estoque) era composta por: NaCl  $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ; EDTA  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ ; Tris-HCl  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH = 10. Esta solução foi preparada e utilizada dentro de 1 mês, sendo armazenada em geladeira.
- **Solução de lise (uso):** A solução de lise (uso) foi preparada no momento do uso da seguinte maneira: 1 mL de triton x-100 e 10 mL de DMSO foram adicionados à 89 mL da solução de lise (estoque). Esta solução foi mantida ao abrigo da luz e a temperatura foi estabilizada em  $4^\circ\text{C}$  antes do uso.
- **Solução A para eletroforese:** A solução A para eletroforese era composta por EDTA  $0,195 \text{ mmol.L}^{-1}$ , pH = 10. Esta solução foi mantida em frasco plástico, em geladeira, por, no máximo, 2 semanas.
- **Solução B para eletroforese:** A solução B para eletroforese era composta por NaCl  $0,4 \text{ g.mL}^{-1}$ , sendo mantida em frasco plástico, ao abrigo da luz (temperatura ambiente).
- **Solução de eletroforese (uso):** A solução de eletroforese (uso) foi preparada no momento do uso, da seguinte maneira: 5 mL da solução de eletroforese A e 30 mL da solução de eletroforese B foram misturados e o volume final foi ajustado para 1 L. A temperatura foi estabilizada em  $4^\circ\text{C}$  antes do uso.
- **Solução de neutralização:** A solução de neutralização era constituída por Tris-HCl  $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH = 7,5, e foi armazenada em geladeira por, no máximo, 1 mês.
- **Tampão fosfato para preparo da agarose:** O tampão fosfato utilizado para preparo da agarose (agarose padrão e baixo ponto de fusão) era composto por  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $14,73 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $4,41 \text{ mmol.L}^{-1}$  e NaCl  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ , pH = 7,4.

- **Gel de agarose para cobertura das lâminas:** Para cobertura das lâminas, foi utilizada uma solução de agarose padrão 1,5 % (m/v) em tampão fosfato.
- **Gel de agarose de baixo ponto de fusão:** A solução de agarose de baixo ponto de fusão foi preparada pela dissolução de agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %; m/v) em tampão fosfato, no micro-ondas.
- **Solução tampão F:** O tampão F foi utilizado para atividade da enzima hOGG1 sobre o DNA. Este tampão era constituído por HEPES 40 mmol.L<sup>-1</sup>, KCl mol.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,5 mmol.L<sup>-1</sup>, BSA 0,2 g.L<sup>-1</sup>, pH = 8. Esta solução foi armazenada em geladeira por até 1 mês.
- **Solução de coloração:** Foi utilizada uma solução de brometo de etídeo 20 µg.mL<sup>-1</sup>, em água ultrapura.

Antes da realização do ensaio cometa, as lâminas (marca Knittel) foram lavadas com solução de extran, enxaguadas com água ultrapura e limpas com etanol 70 % (v/v). Após secagem, a agarose padrão foi fixada às estas lâminas, através do mergulho das mesmas na solução de agarose a 60 °C. Após completa secagem da agarose sobre as lâminas (posição horizontal), as mesmas foram armazenadas em temperatura ambiente.

O plaqueamento, tratamento e coleta das células para o ensaio cometa foi o mesmo descrito em 4.29. Foram analisados os efeitos da fotossensibilização imediatamente e 18 h após o tratamento. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz.

O *pellet* de células foi homogeneizado em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão, a 37 °C. Em seguida, 20 µL desta suspensão foram pipetados sobre as lâminas previamente cobertas com agarose padrão (para cada placa de cultivo, foram feitas 4 lâminas). Rapidamente, as células foram cobertas com uma lamínula, evitando a formação de bolhas e as lâminas foram mantidas em geladeira por 10 min. As lamínulas foram retiradas, com cuidado, e as lâminas foram mergulhadas na solução de lise (uso), ao abrigo da luz, por 48 h. No dia do processamento das amostras, as lâminas foram retiradas da solução de lise e lavadas 2 vezes (5 min cada) em tampão fosfato, a 4 °C. A partir daí, das 4 replicadas de lâminas (4 lâminas

do mesmo tratamento), 2 passaram pelo processo de eletroforese e 2 foram tratadas previamente com a enzima hOGG1, da seguinte maneira:

a. *Tratamento com a enzima hOGG1*: as lâminas foram lavadas 2 vezes (5 min cada) com o tampão F. Foram adicionados, sobre cada lâmina, 0,08 U de hOGG1 (em 50 µL de tampão F). Após cobrir com uma lamínula, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram submetidas à eletroforese (conforme descrito abaixo);

b. *Eletroforese*: as lâminas descansaram por 20 min em tampão de eletroforese a 4 °C. Em seguida, foi realizada a corrida eletroforética (20 min, 25 V, 300 mA, 4°C) em cuba horizontal. As lâminas foram então retiradas da cuba e mergulhadas em tampão de neutralização por 15 min. Após isso, as lâminas secaram à temperatura ambiente e foram fixadas em etanol absoluto por 3 min. Após secagem, as lâminas foram armazenadas em temperatura ambiente até o momento da análise.

Para colorir o DNA, foram adicionados 50 µL da solução de coloração sobre cada lâmina. Cobriu-se a lâmina com lamínula e observou-se o grau de dano ao DNA em microscópio de fluorescência (marca Zeiss, modelo Axiovert 40 CFL), sob filtro verde, aumento de 400 x, ao abrigo da luz. Foram contados 100 nucleóides em cada lâmina, sendo classificados em: grau 0 (sem danos; < 5 % de danos), grau 1 (baixo nível de danos; 5 a 20 % de danos), grau 2 (médio nível de danos; 20 a 40 % de danos), grau 3 (alto nível de danos; 40 a 95 % de danos) e grau 4 (dano total; > 95 % de danos). Após esta contagem, o índice de danos ao DNA (IDN) foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ céls grau 0}) \times 0] + [(\text{n}^\circ \text{ céls grau 1}) \times 1] + [(\text{n}^\circ \text{ céls grau 2}) \times 2] + [(\text{n}^\circ \text{ céls grau 3}) \times 3] + [(\text{n}^\circ \text{ céls grau 4}) \times 4]}{\text{N}^\circ \text{ total de céls analisadas}}$$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 POTENCIAL DAS MELANINAS E DO OXIGÊNIO MOLECULAR SINGLETE DE PROMOVER O DANO AO DNA

#### 5.1.1 Mecanismo pelo qual as melaninas induzem a quebra de fitas de DNA

O papel das melaninas sobre o dano ao DNA foi avaliado utilizando-se o plasmídeo pUC18 como modelo. A feomelanina e, em maior extensão, a eumelanina, levaram à quebra de fitas de DNA, como mostrado na figura 22. A investigação acerca do mecanismo pelo qual as melaninas levam à quebra do DNA foi realizada através do emprego de substâncias que poderiam inibir a reação de diferentes maneiras. Como os resultados foram semelhantes para ambos os tipos de melaninas, serão discutidos conjuntamente. A adição de catalase e de iodeto de potássio (KI) resultou na redução da quebra de DNA em 7-9 vezes, sugerindo o envolvimento do  $H_2O_2$ . De fato, os *o*-difenóis, como a eumelanina, podem sofrer autooxidação, gerando  $O_2^{\cdot-}$  (Heikkila e Cohen, 1973) que, após dismutação espontânea ou redução catalisada pela melanina, pode levar à formação de  $H_2O_2$ , mesmo na ausência de luz (Korytowski, Hintz *et al.*, 1985). Uma vez gerado, o  $H_2O_2$  pode sofrer nova redução por metais de transição, como o  $Fe^{2+}$  e o  $Cu^+$ , resultando nos radicais  $\cdot OH$  altamente reativos, através da reação de Fenton. Isso é consistente com a diminuição da quebra de DNA observada após a adição de DMSO e manitol (*scavengers* de  $H_2O_2$ ) ou de deferoxamina e batocuproína (quelantes de  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$ , respectivamente) ao meio de reação (Figura 22). A ocorrência do dano ao DNA pela exposição ao  $Fe^{2+}$  e  $H_2O_2$  é bem documentada (Kennedy, Moore *et al.*, 1997; Lloyd, Carmichael *et al.*, 1998) e, nesse caso, os radicais  $\cdot OH$  são as espécies envolvidas na oxidação das bases do DNA (Frelon, Douki *et al.*, 2002). À medida que o  $Fe^{2+}$  é oxidado à  $Fe^{3+}$ , ele pode ser reduzido novamente à sua forma ferrosa pelo  $O_2^{\cdot-}$ , alimentando a reação de Fenton. Dessa forma, o efeito observado após a adição da SOD ao meio de reação, que levou à redução de 50 % das quebras (Figura 22), poderia ser explicado pela diminuição da reciclagem do  $Fe^{2+}$ , uma vez que uma ação direta do  $O_2^{\cdot-}$  sobre o DNA é menos provável, haja vista sua baixa reatividade frente à esta biomolécula (Cadet e Treoule, 1978; Cadet, Berger *et al.*, 1986).



É apropriado mencionar que, quando o cobre e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  promovem o dano ao DNA, o mecanismo é diferente daquele descrito para o ferro. Quando o  $\text{Cu}^+$  está presente, a oxidação por um elétron, e não os radicais  $\cdot\text{OH}$ , parece ser a principal responsável pelo dano ao DNA (Frelon, Douki *et al.*, 2003). Por outro lado, quando o  $\text{Cu}^{2+}$  é o catalisador da oxidação do DNA, o  $^1\text{O}_2$  é a principal espécie envolvida (Yamamoto, Inoue *et al.*, 1989; Ma, Cao *et al.*, 1999; Frelon, Douki *et al.*, 2003). A ocorrência de um processo similar foi sugerida quando o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi gerado por um sistema cobre / hidroquinona (Li e Trush, 1993). Considerando que o  $^1\text{O}_2$  esteja sendo formado pelo sistema  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ , a inibição das quebras do DNA após a adição da azida sódica (Figura 22) poderia ser relacionada à atividade de *quencher* de  $^1\text{O}_2$ , embora possa também estar relacionada à habilidade da azida de ser quelante de cobre. Há muita discussão acerca da habilidade do  $^1\text{O}_2$  gerar quebra de fitas. O mecanismo mais aceito é a oxidação da 8-oxodGuo, uma vez que esta é mais reativa do que a dGuo (Sheu e Foote, 1995). Já foi demonstrado que a oxidação da 8-oxodGuo forma ácido oxalúrico em oligonucleotídeos (Duarte, Gasparutto *et al.*, 2001) e, uma vez que essa lesão é mais lábil que a 8-oxodGuo, poderia ser o precursor da quebra de fita simples de DNA (Tretyakova, Wishnok *et al.*, 2000; Theruvathu, Jaruga *et al.*, 2007).

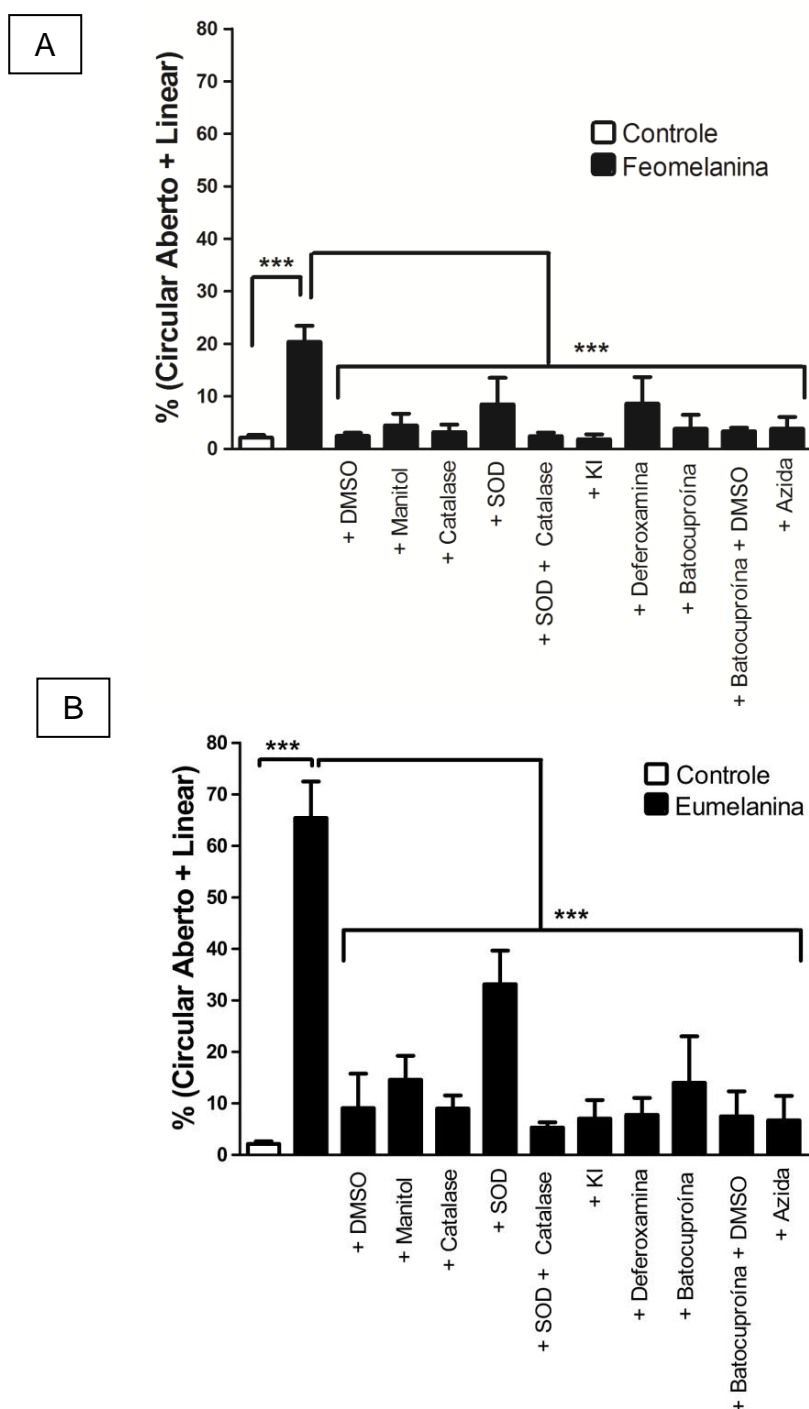


FIGURA 22: INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA QUEBRA DO DNA PELAS MELANINAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Efeito da feomelanina (A) e da eumelanina (B) sobre o dano ao DNA e investigação acerca do mecanismo de quebra. Os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) foram incubados sob agitação constante na presença de  $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de eumelanina ou feomelanina por 2,5 h a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. Para investigação do mecanismo de quebra, foram adicionados: DMSO 20 mM, manitol 200 mM, catalase  $100 \text{ U.mL}^{-1}$  e/ou SOD  $1.000 \text{ U.mL}^{-1}$ , KI 10 mM, deferoxamina 20 mM, batocuproína 20 mM ou azida sódica 200 mM. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,001$ .

O envolvimento do  $\cdot\text{OH}$  no dano oxidativo no DNA causado pelas melaninas foi confirmado após a quantificação de dois tipos de bases oxidadas: a 8-oxodGuo e a ThdGly (5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimidina) (Figura 23). Enquanto a 8-oxodGuo pode ser formada por uma gama de oxidantes (incluindo o  $\cdot\text{OH}$  e o  $^1\text{O}_2$ ), a ThdGly é resultante apenas da ação do  $\cdot\text{OH}$  sobre o DNA (Cadet, Douki *et al.*, 2010). Baseando-se em estudos anteriores (Ravanat, Saint-Pierre *et al.*, 2001), já era esperado o aumento dos níveis de 8-oxodGuo, e não de ThdGly, após o tratamento do DNA com o gerador de  $^1\text{O}_2$ , DHPNO<sub>2</sub>, uma vez que o  $^1\text{O}_2$  é pouco reativo frente à timina (Figura 23). Por outro lado, quando o DNA foi tratado com as melaninas, houve aumento tanto de 8-oxodGuo quanto de ThdGly (Figura 23), o que é consistente com a ideia da formação de  $\cdot\text{OH}$  pelas melaninas, confirmando nossos achados anteriores (Figura 22). Os níveis de 8-oxodGuo foram superiores nas amostras tratadas com eumelanina em relação às aquelas tratadas com feomelanina, concordando com os dados achados no ensaio de quebra de fitas (Figura 22).

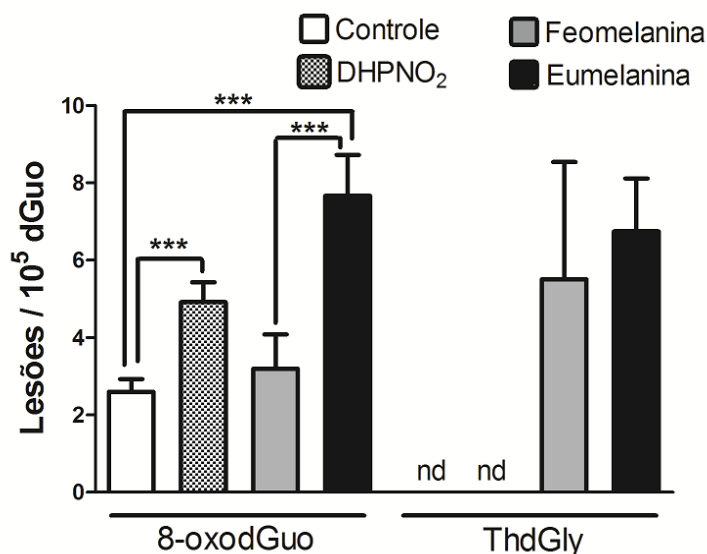


FIGURA 23: QUANTIFICAÇÃO DOS NUCLEOSÍDEOS OXIDADOS APÓS INCUBAÇÃO DOS PLASMÍDEOS pUC18 COM AS MELANINAS OU DHPNO<sub>2</sub>.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os plasmídeos pUC18 (13,33 ng.μL<sup>-1</sup>) foram incubados sob agitação constante na presença de 400 μg.mL<sup>-1</sup> de eumelanina ou feomelanina ou com DHPNO<sub>2</sub> 20 mM por 2,5 h a 37 °C, ao abrigo da luz. Os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão de 2 experimentos independentes em triplicata. \*\*\* p<0,001. nd: Não detectado.

A presença de íons de cobre e ferro na amostra de feomelanina não era esperada, uma vez que essa propriedade não havia sido descrita anteriormente,

embora o protocolo de síntese de feomelanina baseada no uso da tirosinase tenha sido largamente utilizado (Dunford, Land *et al.*, 1995; Krol e Liebler, 1998; Mars e Larsson, 1999). Considerando que não é realizada uma etapa de remoção da tirosinase segundo aquele protocolo, mas que condições como redução do pH até 3 e lavagem com solventes orgânicos são requeridas durante a purificação da feomelanina (Ito, 1989), é possível que os íons cobre sejam liberados da tirosinase e se liguem à feomelanina. Ainda neste sentido, é sabido que traços de íons ferro estão presentes em tampões fosfato (Miller, Buettner *et al.*, 1990), utilizado na síntese da feomelanina. A presença dos íons cobre e ferro foi confirmada por EPR (Figura 24) e, embora ambos tenham aparecido como contaminantes de síntese, a significância dos nossos resultados é mantida, uma vez que as melaninas são normalmente encontradas ligadas à íons inorgânicos positivamente carregados, através de suas funções carboxil (Potts e Au, 1976; Riley, 1997). Essa propriedade confere aos melanossomos a função de reservatórios de metais, os quais regulam o estoque, a liberação e a troca de íons metálicos no ambiente celular (Hong e Simon, 2007). Adicionalmente, um acúmulo aumentado de íons metálicos foi encontrado em células de melanoma (Bedrick, Ramaswamy *et al.*, 1986). Levando isso em conta, os níveis de melanina não ligada aos metais no ambiente celular devem ser mínimos, sendo praticamente certo que todos os efeitos biológicos das melaninas advêm de sua forma ligada aos metais.

É interessante notar que, enquanto íons  $\text{Cu}^{2+}$  foram detectados no EPR (detalhe da Figura 24), um efeito inibitório no experimento de quebras de fitas de DNA foi obtido utilizando-se um quelante específico de  $\text{Cu}^+$ , a batocuproína (Figura 22). Esse dado dá suporte à ideia de um envolvimento direto da feomelanina na química redox do cobre como anteriormente relatado em estudo envolvendo o papel do cobre e peróxido de hidrogênio na degradação da eumelanina (Korytowski e Sarna, 1990).

Assim como já foi relatado por outros autores (Sealy, 1984), foram observados radicais estáveis das melaninas (Figura 24). Entretanto, o efeito direto desses radicais de melanina sobre o DNA deve ser minoritário, uma vez que uma inibição praticamente completa da quebra do DNA foi observada com o emprego de agentes desativadores de EROS (Figura 22).

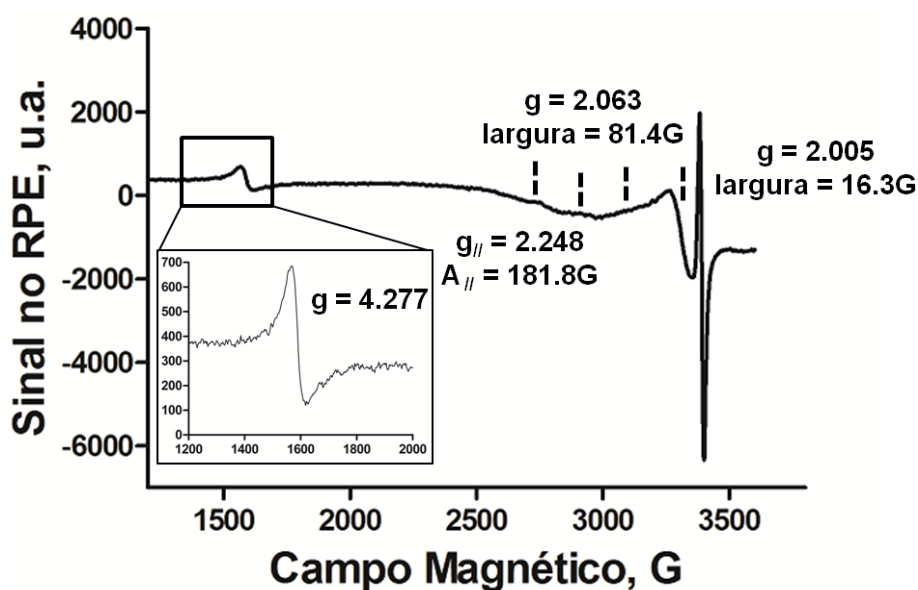


FIGURA 24: ESPECTRO DE EPR DA FEOMELANINA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: O sinal em  $g = 4.277$  é característico aos íons ferro (spin  $3/2$ ). O sinal intermediário com estrutura hiperfina ( $g_{||} = 2.248$ ;  $A_{||} = 181.3\text{G}$ ;  $g_{\perp} = 2.063$ ) corresponde aos íons cobre (II). O sinal singlete ( $g = 2.005$ , largura =  $16.3\text{G}$ ) é referente ao radical estável da feomelanina.

Em relação ao mecanismo pelo qual as melaninas quebram o DNA, ambos os tipos de melanina parecem agir da mesma maneira. Entretanto, é evidente que suas diferenças estruturais resultam em diferentes habilidades de levar à quebra do DNA, uma vez que a feomelanina teve um efeito mais brando do que a eumelanina na indução do dano ao DNA (Figura 22). Além disso, a formação da quebra de fitas no DNA ao longo do tempo foi menor na presença da feomelanina, alcançando os níveis de *plateau* antes da eumelanina (Figura 25).

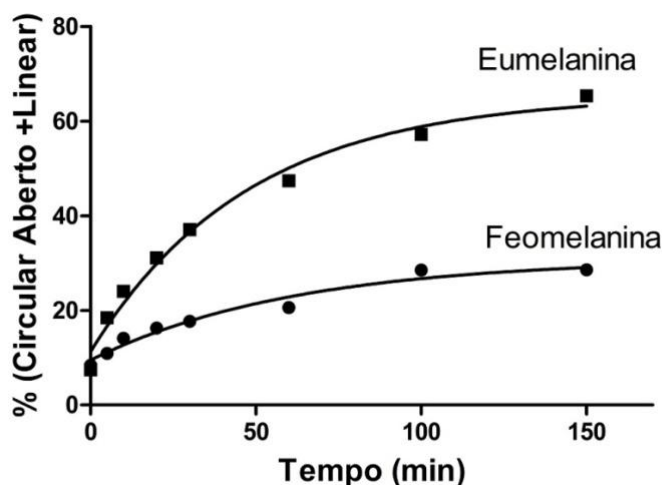


FIGURA 25: CINÉTICA DE INDUÇÃO DA QUEBRA DO DNA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng.mL}^{-1}$ ) foram incubados sob agitação constante na presença de  $400 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$  de eumelanina ou feomelanina, a  $37^\circ \text{C}$ , ao abrigo da luz. Alíquotas do plasmídeo foram retiradas entre os tempos 0 e 150 min e a formação das quebras foi avaliada após corrida eletroforética em gel de agarose.

A diferença dos níveis de quebras no DNA induzidas pela eu- e feomelanina (Figuras 22 e 25) pode ser devido às suas diferenças estruturais, que podem resultar em capacidades distintas de gerar EROS. Além de diferenças estruturais, conteúdos desiguais de metais ligados a cada tipo de melanina podem contribuir para este efeito.

#### 5.1.2 Propagando o dano: liberação de ferro da ferritina

Considerando que o principal mecanismo pelo qual as melaninas levam à quebra de fitas do DNA depende da presença de íons metálicos como o ferro e o cobre, e também que a metaloproteína ferritina é superexpressa no melanoma metastático (Baldi, Battista *et al.*, 2003), contribuindo para a sua progressão (Baldi, 2005), a habilidade das melaninas levarem à liberação do ferro da ferritina foi avaliada. Ambos os tipos de melanina foram capazes de levar à liberação do ferro da ferritina com cinéticas bastante similares (Figura 26). Este resultado é bastante interessante, uma vez que os íons ferro liberados da ferritina podem se ligar às melaninas, desta forma, amplificando o potencial lesivo destes pigmentos. Esta propriedade poderia resultar num profundo distúrbio da homeostase redox celular.

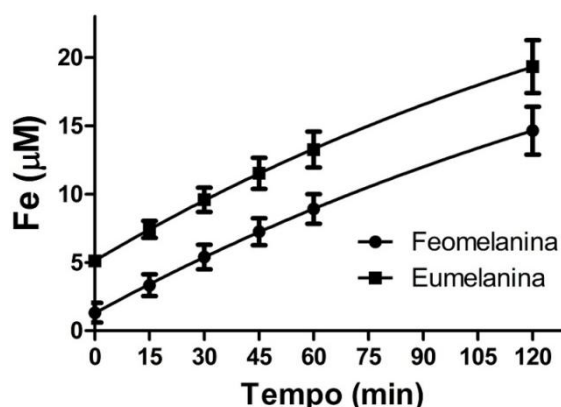


FIGURA 26: EFEITO DAS MELANINAS SOBRE A LIBERAÇÃO DO FERRO DA FERRITINA AO LONGO DO TEMPO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A liberação dos íons ferro da ferritina de baço de cavalo ( $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foi monitorado pelo aumento da absorbância em 530 nm, devido à formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -batofenantrolina quando incubado na presença das melaninas ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os dados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes.

### 5.1.3 Ação do $^1\text{O}_2$ sobre o dano oxidativo ao DNA causado pelas melaninas

A interação e os efeitos do  $^1\text{O}_2$  e das melaninas no dano ao DNA são de interesse devido à participação de ambos na etiologia do melanoma e também no sentido de otimizar o uso da PDT neste tipo de neoplasia. Desta maneira, após observar que as melaninas são capazes de levar à quebra do DNA, foi avaliado o efeito do  $^1\text{O}_2$  sobre este sistema, empregando o DHPNO<sub>2</sub> como uma fonte química de  $^1\text{O}_2$ . O DHPNO<sub>2</sub> decompõe em seu derivado de naftaleno quando incubado a 37 °C, no escuro, sendo que aproximadamente 60 % do oxigênio é liberado na sua forma excitada (Dewilde, Pellieux *et al.*, 1998). De forma interessante, quando o DHPNO<sub>2</sub> foi co-incubado com as melaninas, houve uma redução da quebra do DNA (Figura 27 A). O efeito inibitório foi superior para a eumelanina, havendo uma redução de mais de 50 % das formas circular aberta + linear na presença do DHPNO<sub>2</sub>. Os grupos controle utilizando DHPNO<sub>2</sub> previamente decomposto mostraram que o próprio DHPN estava desempenhando um papel neste sistema, devido a uma possível ação como *scavenger* de  $\cdot\text{OH}$ . Independentemente desta interferência, este resultado aponta para uma possível interação entre  $^1\text{O}_2$  e melaninas. Recentemente, Chiarelli-Neto, Pavani e colaboradores (2011) descreveram que a fotossensibilização das melaninas sob luz visível (532 nm) leva

apenas à formação de  $^1\text{O}_2$ , pelo mecanismo do tipo II. No referido estudo, foi proposta a possibilidade da melanina reagir com o  $^1\text{O}_2$ . Este método recém-descrito foi empregado para pré-tratar as melaninas com o  $^1\text{O}_2$  e checar a hipótese de que as melaninas pré-oxidadas pelo  $^1\text{O}_2$  possuem menor habilidade de quebrar o DNA. As melaninas foram irradiadas por LEDs (emissão máxima em 526 nm) antes de serem incubadas com o DNA. Corroborando com os resultados descritos anteriormente, as melaninas oxidadas pelo  $^1\text{O}_2$  foram menos capazes de induzir quebras de fita de DNA (Figura 27 B), de maneira dose-dependente (Figura 27 C). Neste contexto, os resultados sugerem que, de alguma forma, o  $^1\text{O}_2$  interfere na ação melaninas, diminuindo os efeitos causados por esses pigmentos sobre o DNA. Este é um resultado interessante, pois, pelo menos do nosso conhecimento, é a primeira vez que se propõe um efeito protetor do  $^1\text{O}_2$  sobre danos ao DNA induzidos por um terceiro agente.



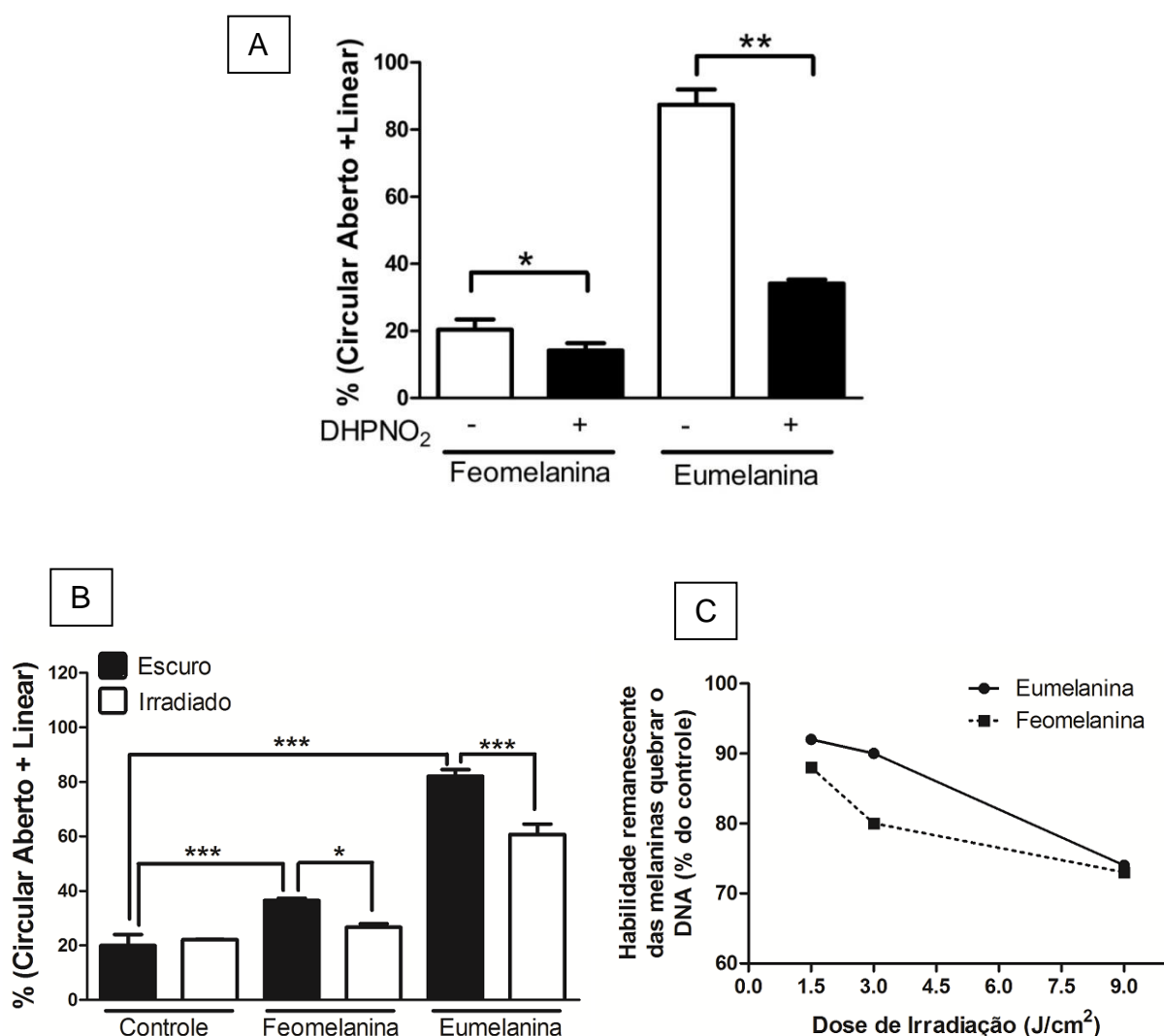


FIGURA 27: EFEITO DO  $^1\text{O}_2$  NA QUEBRA DE DNA INDUZIDA PELAS MELANINAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: (A) Os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) foram incubados sob agitação constante com feomelanina ou eumelanina  $400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  e DHPNO<sub>2</sub>  $20 \text{ mM}$  por  $2,5 \text{ h}$  a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes.  $*p<0,05$  e  $**p<0,01$ , após análise estatística pelo teste *t*-Student. (B) As melaninas ( $400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7$ ) foram irradiadas em  $526 \pm 20 \text{ nm}$ , totalizando uma dose de  $9 \text{ J/cm}^2$ . Após isso, os plasmídios ( $13,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados ao meio e a reação foi conduzida  $2,5 \text{ h}$ , a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. Os resultados estão expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes.  $*p<0,05$  e  $***p<0,001$ , após análise de variância ANOVA, seguido do teste Tukey. (C) As melaninas ( $400 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$  em tampão fosfato,  $\text{pH} = 7$ ) foram irradiadas em  $526 \pm 20 \text{ nm}$ , totalizando uma dose entre  $1,5$  e  $9 \text{ J/cm}^2$ . Os plasmídeos pUC18 ( $13,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ ) foram adicionados ao meio e a reação foi conduzida  $2,5 \text{ h}$ , a  $37^\circ\text{C}$ , ao abrigo da luz. O gráfico mostra a habilidade remanescente das melaninas irradiadas pelos LEDs induzir a quebra de fitas do DNA em relação às melaninas não irradiadas (em porcentagem). Os dados são mostrados como a média de um experimento em triplicata.

Reforçando a idéia de que as melaninas reagem com  $^1\text{O}_2$ , foi observado um clareamento das melaninas após o tratamento com o DHPNO<sub>2</sub> (Figuras 28 A e B). O

mesmo resultado foi encontrado por outros autores quando melaninas foram fotossensibilizadas na presença de Rosa Bengala (Sealy, Sarna *et al.*, 1984; Sarna, Menon *et al.*, 1985). Este efeito pode estar relacionado à alterações estruturais das melaninas após sua reação com o  $^1\text{O}_2$ . Para testar esta hipótese, utilizou-se a unidade monomérica da eumelanina, o DHICA, como modelo (detalhe da Figura 28 D). Isto foi necessário porque a propriedade amorfa das melaninas torna-as difíceis de se analisar por meios convencionais, sendo, desta forma, mais fácil lidar com a unidade monomérica, de estrutura conhecida. O DHICA foi incubado com o DHPNO<sub>2</sub> e os produtos da reação foram analisados por HPLC. O pico do DHICA (tempo de retenção = 6 min, confirmado por espectro de absorção no UV e por espectrometria de massas; Figuras 28 C e D, respectivamente) desapareceu após a incubação com o DHPNO<sub>2</sub>, indicando o consumo de DHICA pelo  $^1\text{O}_2$  (Figura 28 C). Não foram realizadas tentativas para se identificar os produtos desta reação, pois o principal objetivo neste momento era confirmar que o DHICA era suscetível à oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ . Este resultado proporciona uma forte evidência de que as melaninas reagem com o  $^1\text{O}_2$ , gerando outros produtos possivelmente mais inertes do que a própria melanina. Assim, as melaninas podem ser consideradas como potenciais *scavengers* de  $^1\text{O}_2$ . Já havia sido previamente sugerido que poderia ocorrer a adição do  $^1\text{O}_2$  ao anel indólico da melanina (Chiarelli-Neto, Pavani *et al.*, 2011), mas o significado biológico deste efeito não havia sido ainda descrito. Outros autores também já propuseram que as melaninas poderiam ser *quenchers* de  $^1\text{O}_2$  (Tada, Kohno *et al.*, 2010). Desta forma, ao contrário do que se acreditava, a PDT pode ter baixa eficácia não só porque as melaninas absorvem a luz e, portanto, diminuem a excitação dos fotossensibilizadores, mas também porque as células de melanoma possuem efetivos *scavengers* de  $^1\text{O}_2$ : as melaninas.

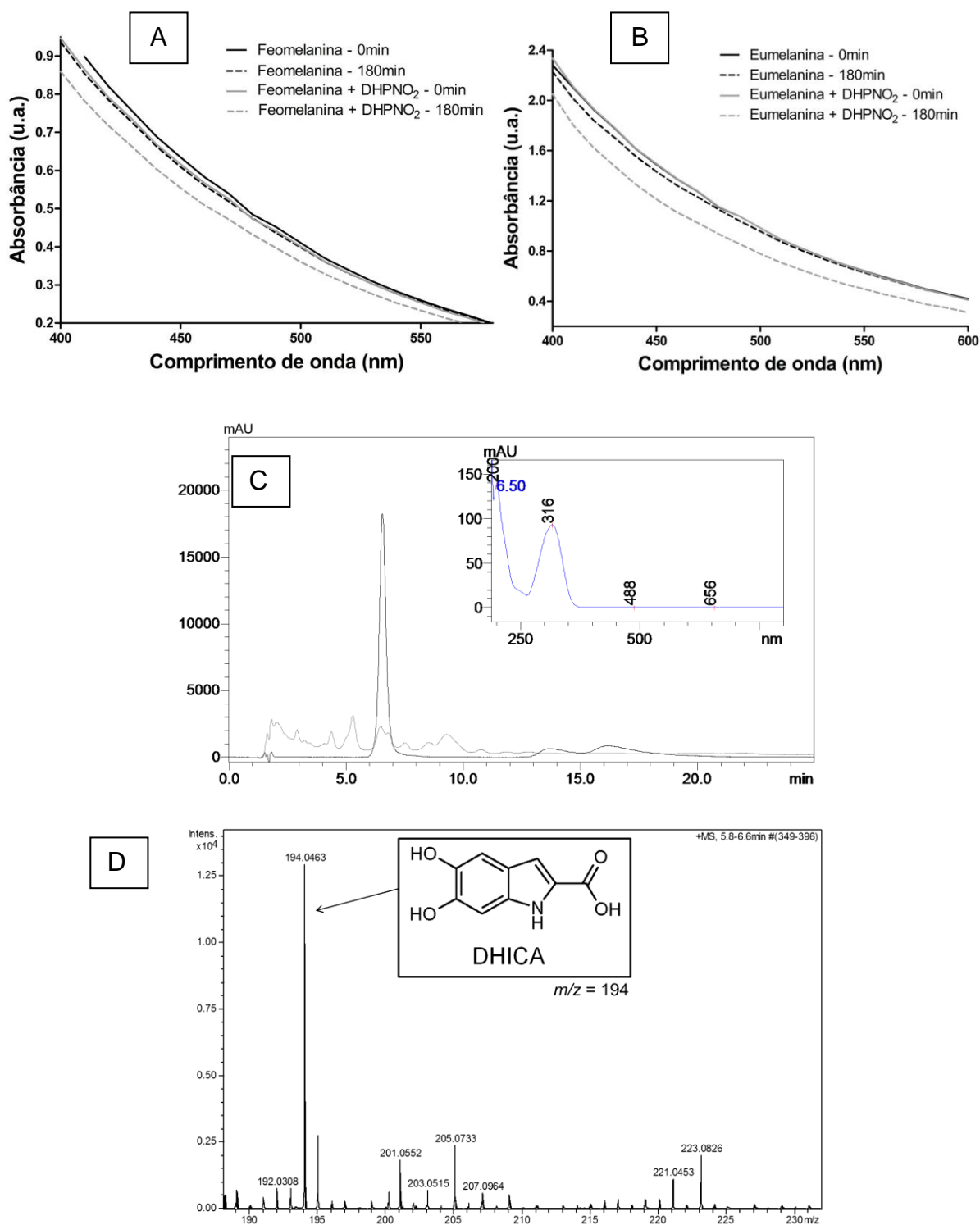


FIGURA 28: EVIDÊNCIAS DA REAÇÃO DO  $^1\text{O}_2$  COM AS MELANINAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A diminuição da absorbância entre 400-600 nm foi observada quando a feomelanina (A) ou eumelanina (B) ( $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , em tampão fosfato, pH = 7) foram incubadas com DHPNO<sub>2</sub> 20 mM por 180 min. (C) Cromatograma representativo do DHICA ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) antes (linha preta) e após a incubação com DHPNO<sub>2</sub> 10 mM (linha cinza). O detalhe mostra o espectro UV-VIS do pico do DHICA nas condições de análise empregadas. (D) Espectro de MS do pico de DHICA. A estrutura do DHICA é mostrada no detalhe.

#### 5.1.4 Reconhecimento de lesões no DNA causadas pelas melaninas por enzimas de reparo

Uma vez que foi demonstrado que as melaninas são capazes de danificar o DNA através de reação do tipo Fenton e que podem proteger o DNA contra a oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ , foi investigada a ocorrência de sítios sensíveis à FPG ou à Endo III após a incubação das melaninas com o DNA. Ambas as enzimas participam do sistema de reparo de DNA e catalisam uma reação de duas etapas: a primeira é a remoção da base oxidada (atividade de N-glicosilase), o que gera um sítio AP, seguido da clivagem em 3' e 5' no sítio AP (atividade de AP-liase), levando à formação de uma lacuna. A principal diferença entre as duas enzimas de reparo é que a FPG reconhece bases purínicas oxidadas, como 8-oxo-7,8-dihidroadenina, 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyGua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidina (FapyAde), 5-hidroxicitosina e 5 hidroxiuracila (Tchou, Bodepudi *et al.*, 1994), enquanto a Endo III (também abreviada como Nth) tem maior especificidade por lesões como a uréia, ThdGly, 5-hidroxi-5-metilhidantoina, 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrouracil (glicol uracil), metiltartroniluréia, dentre outras (Hatahet, Kow *et al.*, 1994). Assim, o reconhecimento de bases oxidadas por essas enzimas leva ao aumento da quantidade de plasmídeos quebrados, que podem ser visualizados após corrida eletroforética em gel de agarose. De forma consistente com a literatura, o  $^1\text{O}_2$  causou poucas quebras no DNA (Di Mascio, Wefers *et al.*, 1989; Devasagayam, Steenken *et al.*, 1991; Khan, Mei *et al.*, 1992; Berra, Menck *et al.*, 2010) e gerou sítios sensíveis à FPG, mas não à EndoIII (Schulz, Mahler *et al.*, 2000; Ravanat, Sauvaigo *et al.*, 2004). Entretanto, no caso das melaninas, não foram detectados sítios reconhecidos nem pela FPG, nem pela EndoIII (Figura 29).

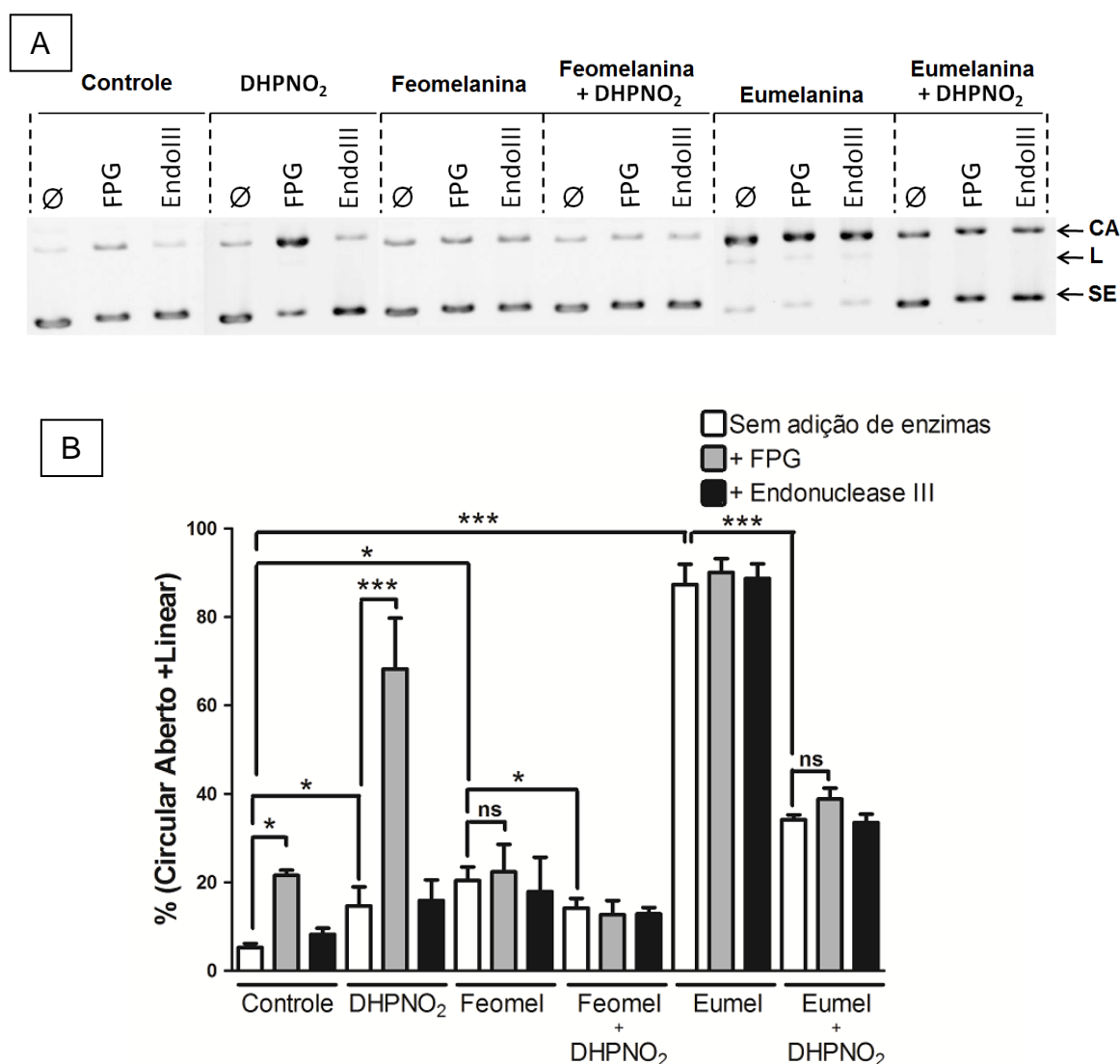


FIGURA 29: DANO AO DNA APÓS INCUBAÇÃO COM DHPNO<sub>2</sub> E/OU MELANINAS E O RECONHECIMENTO DE BASES OXIDADAS POR ENZIMAS DE REPARO DE DNA.

FONTE: o autor (2012).

NOTAS: (A) Gel eletroforético representativo mostrando o efeito da feomelanina e da eumelanina no dano ao DNA causado pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Ø: sem incubação com enzimas de reparo de DNA (FPG e Endo III); (CA) forma circular aberta; (L) forma linear; (SE) forma superenovelada. (B) Porcentagem de DNA nas formas circular aberta e linear após incubação com 20 mM de DHPNO<sub>2</sub> ou feomelanina / eumelanina (400 µg.mL<sup>-1</sup>, em tampão fosfato, pH = 7). Eumel: eumelanina; Feomel: feomelanina. O gráfico representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001. ns: não significativo.

Considerando estes resultados, a meia-vida muito curta dos radicais <sup>•</sup>OH (constantes de reação do <sup>•</sup>OH / DNA: 0,4 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (Michaels, Tchou *et al.*, 1992); <sup>•</sup>OH / feomelanina: 1,1 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>; <sup>•</sup>OH / eumelanina: 1,5 x 10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> (Sarna, Pilas *et al.*, 1986)) e a estrutura da melaninas, surgiu a hipótese de que melaninas poderiam estar interagindo intimamente com o DNA; desta forma, evitando o

reconhecimento de bases danificadas pelas enzimas de reparo. Como o ligante de sulco menor Hoechst 33342 compartilha alguma semelhança estrutural com as melaninas (também formadas por anéis indólicos, ver Figura 30 A), foi investigado se as melaninas poderiam competir pelos sítios de ligação do Hoechst, através da avaliação da fluorescência do Hoechst após sua ligação com DNA. Se as duas moléculas competissem pelo mesmo sítio, a adição de melaninas ao DNA ligado ao Hoechst resultaria em uma diminuição de sua fluorescência. De fato, tanto a feomelanina quanto a eumelanina mostraram-se capazes de se ligar ao sulco menor do DNA (Figura 30 B e C). Esta propriedade faz das melaninas agentes muitos lesivos para o DNA. Se a excisão de bases danificadas for reduzida pela ligação de melaninas ao DNA, os erros durante replicação podem ser perpetuados, resultando no acúmulo de mutações genéticas e contribuindo para a instabilidade genética do melanoma. De fato, foi mostrado que nevo displásico acumula mais sítios sensíveis à FPG no DNA que melanócitos normais (Smit, Van Nieuwpoort *et al.*, 2008) e que as células que são incubadas na presença de melaninas possuem mais bases oxidadas em seu DNA (Hill e Hill, 1987). Esse resultado pode ser devido à promoção de lesões ao DNA pelas melaninas e / ou pela falta de reparo das bases oxidadas. Recentemente, foi demonstrado que os melanócitos são menos eficazes em reparar o DNA após a irradiação UVA do que fibroblastos normais. Nesse estudo, os autores propuseram que poderia estar ocorrendo uma interação entre melaninas e enzimas de reparo de DNA, ou ainda, com o próprio DNA, mas o mecanismo não havia sido esclarecido (Wang, Choi *et al.*, 2010).

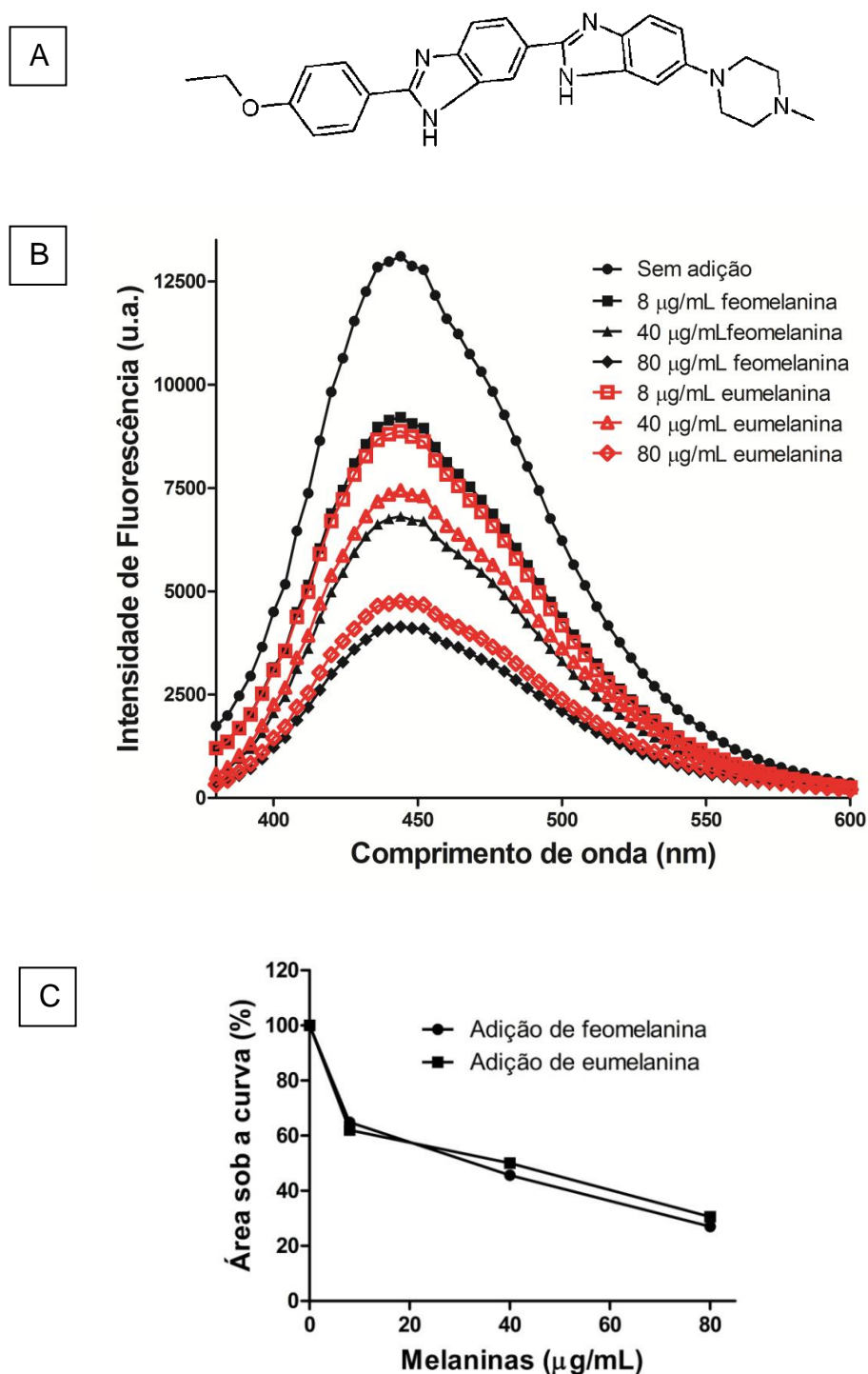


FIGURA 30: COMPETIÇÃO ENTRE AS MELANINAS E O HOECHST 33342 PELO SULCO MENOR DO DNA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: (A) Estrutura molecular do corante Hoechst 33342. (B) O Hoechst 33342 foi misturado com o plasmídeo e o espectro de emissão de fluorescência do corante foi obtido na faixa entre 370-600 nm, sob excitação em 343 nm. A curva mais elevada corresponde à amostra em que não foram adicionadas as melaninas. Conforme as melaninas foram sendo adicionadas, foi observado um decréscimo na fluorescência. (C) A integração da área sob a curva dos dados apresentados em (B) é mostrada para fornecer uma melhor visualização do efeito das melaninas na ligação do Hoechst ao DNA.

Por último, foi confirmada a habilidade das melaninas de impedir o reconhecimento das bases danificadas por enzimas de reparo de DNA. Os plasmídeos foram incubados com DHPNO<sub>2</sub> para gerar 8-oxodGuo e, então, a enzima FPG foi adicionada na presença e na ausência das melaninas. Como controle, foram utilizados dois ligantes de sulco menor conhecidos, o verde de metila e o Hoechst 33342. Uma vez que a própria presença das melaninas poderia aumentar a quantidade de DNA quebrado, utilizou-se um curto período de incubação neste experimento. Observou-se que a enzima FPG teve atividade menor sobre o DNA oxidado quando foi adicionada conjuntamente com as melaninas (Figura 31), sugerindo que esta enzima não foi capaz de atingir o DNA danificado e reconhecer as lesões pré-formadas. Este efeito é provavelmente devido à capacidade de ligação das melaninas ao DNA, o que pode ter prejudicado o acesso das enzimas de reparo ao DNA lesionado. Não se pode descartar a possibilidade de uma interação direta entre as melaninas e a enzima ou que as melaninas estejam levando à perda da atividade da enzima; essa hipótese é suportada pelo fato de que intermediários de síntese de melanina interagem com o DNA e prejudicam a atividade da desoxirribonuclease I (Miranda, Botti *et al.*, 1984). Independentemente disto, nossos resultados são de grande importância, uma vez que destacam o efeito nocivo de melaninas em DNA: elas não só possuem o potencial de gerar EROS altamente reativas e levar à quebra do esqueleto do DNA, mas também de impedir o reparo do DNA.



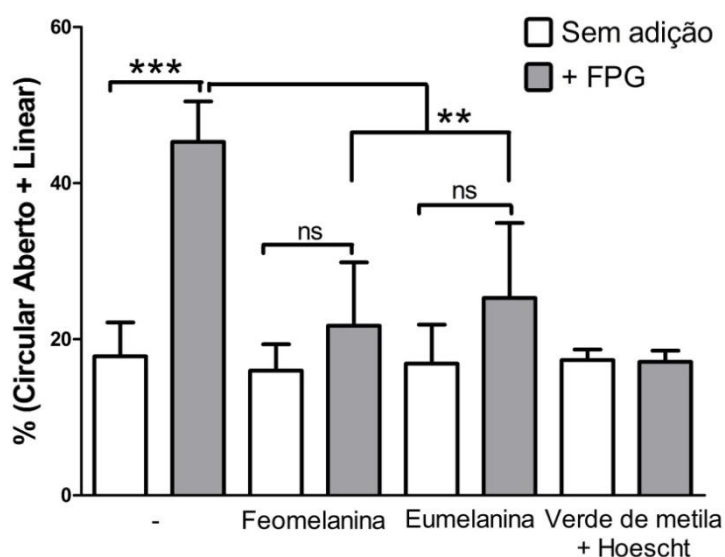


FIGURA 31: DIMINUIÇÃO DO POTENCIAL DE RECONHECIMENTO DE LESÕES NO DNA PELA ENZIMA FPG NA PRESENÇA DAS MELANINAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTAS: Os plasmídeos foram incubados na presença de DHPNO<sub>2</sub> 20 mM a 37 °C por 2,5 h e então incubados com a enzima FPG na presença de feomelanina ou eumelanina (400 µg.mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato, pH = 7) a 37 °C por 30 min. O verde de metila e o Hoechst 33342 foram usados como controle. Os resultados estão expressos como a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001. ns: não significativo.

Em conjunto, nossos dados demonstram um papel duplo das melaninas: ao mesmo tempo em que podem oxidar e quebrar o DNA *via* reação de Fenton, são bons *scavengers* de <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. De forma interessante, as melaninas oxidadas pelo o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> são menos capazes de quebrar o DNA; possivelmente um reflexo das mudanças estruturais que ocorrem em sua estrutura. Além de gerarem danos oxidativos ao DNA, as melaninas podem se ligar ao mesmo e impedir o acesso de enzimas de reparo, o que poderia resultar na perpetuação dos danos. Estes dados podem contribuir como base para o entendimento dos processos que ocorrem durante a formação e evolução do melanoma.

## 5.2 EFEITO DO CONTEÚDO DE FEOMELANINA EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO E SUA RESPOSTA FRENTE AO TRATAMENTO COM O OXIGÊNIO SINGLETE

### 5.2.1 Otimização dos parâmetros para dosagem de feomelanina intracelular por HPLC

A feomelanina pode ser quantificada pelos seus produtos de degradação, os isômeros AT e AHP. O AHP é mais específico para a feomelanina, tendo em vista que outras substâncias, como a 3-nitrotirosina, também podem dar origem ao AT, após sofrer ação do ácido iodídrico (Wakamatsu, Ito *et al.*, 2002).

Apesar de a detecção poder ser realizada por espectrofotometria (os isômeros AT e AHP absorvem da região do UV), o método eletroquímico é mais sensível e, desta forma, mais eficaz para a detecção de níveis basais de uma determinada substância. Como o AT e o AHP permitem esse tipo de análise, as condições ótimas foram padronizadas para os equipamentos utilizados neste trabalho.

O passo inicial para padronização foi a escolha do potencial empregado nas celas eletroquímicas de detecção, através do voltamograma hidrodinâmico. Este passo é importante para que seja conhecido o menor potencial necessário em que se obtém eletrólise total da amostra. Assim, evita-se aplicar potenciais mais altos do que o necessário, que podem acabar gerando excesso de ruídos no cromatograma. O valor do potencial é sempre obtido empiricamente para condições experimentais determinadas.

Desta forma, injetou-se 20  $\mu\text{L}$  do padrão de AT ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) nas mesmas condições utilizadas para a detecção dos produtos de hidrólise da feomelanina. A cada injeção, o potencial aplicado na cela eletroquímica do detector ESA Coulochem® III (cela analítica ESA 5011A) foi aumentado, no intervalo entre 25 e 500 mV. Os cromatogramas obtidos estão ilustrados na figura 32 A. As áreas obtidas dos picos de AT foram plotados em função do potencial aplicado e observou-se um *plateau* após 250 mV (Figura 32 B). Foi escolhido o potencial de 300 mV para as posteriores análises.

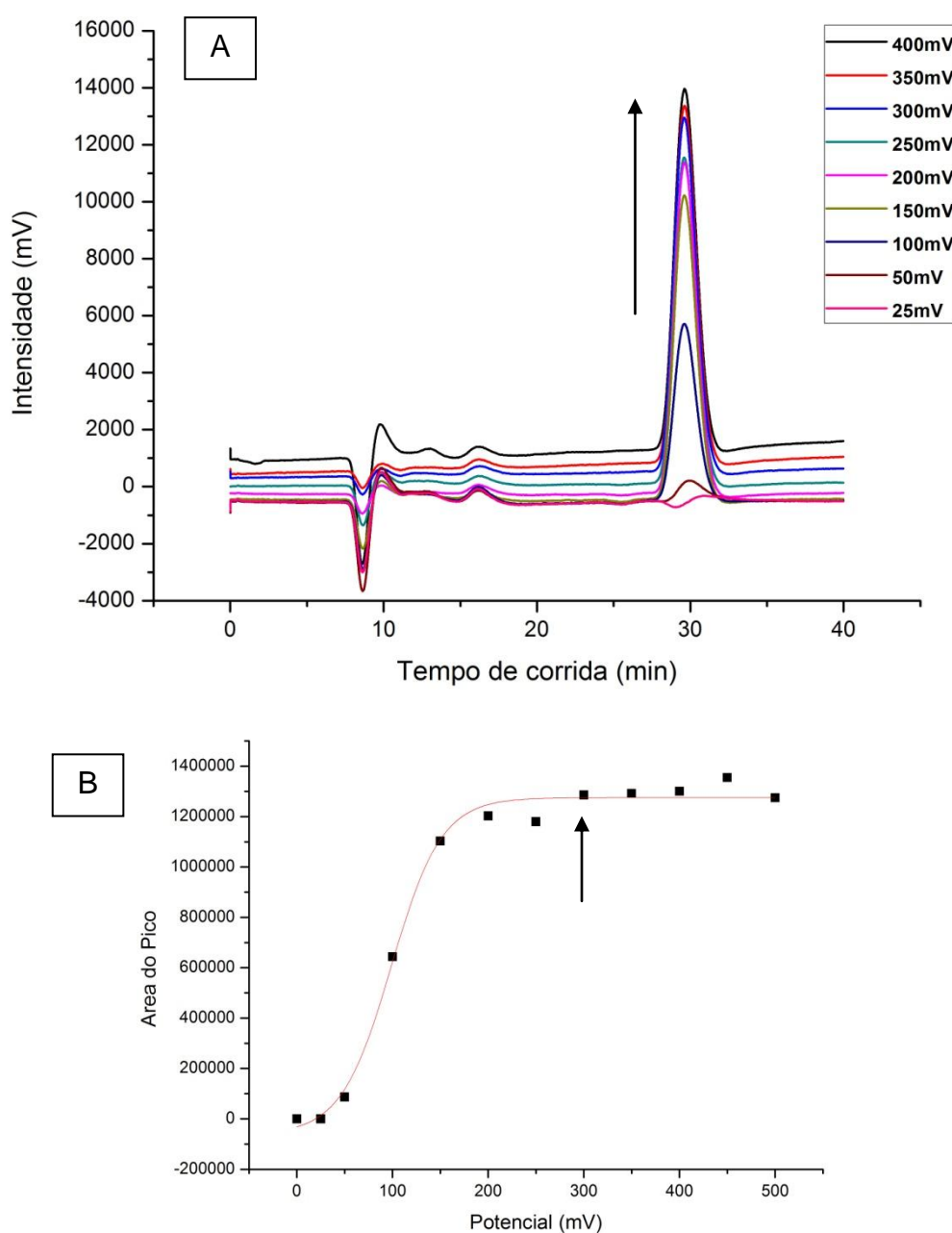


FIGURA 32: VOLTAMOGRAMA HIDRODINÂMICO DE AT.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: (A) Cromatograma observado quando diferentes potenciais foram aplicados à amostra de AT ( $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), resultando em picos com áreas crescentes. (B) Os resultados do experimento foram plotados em um gráfico da área dos picos versus o potencial utilizado, resultando em uma curva sigmóide ( $R^2 = 0,99431$ ). Observou-se um *plateau* da área referente à oxidação de AT a partir de 250 mV. A seta ( $\rightarrow$ ) aponta para o potencial escolhido para as análises posteriores (300 mV).

### 5.2.2 Modulação da síntese de feomelanina em células de melanoma da linhagem SK-Mel23

Inicialmente, para atingir o propósito de estudar os efeitos da presença de feomelanina em uma linhagem de melanoma humano, foi utilizada a linhagem metastática SK-Mel23. Esta linhagem é conhecidamente pigmentada (cerca de 7,1 µg de melanina total / 10<sup>6</sup> células), possui alta atividade de DOPA oxidase (quando comparada à outras linhagens de melanoma humano) e expressa tirosinase, TRP-1 e TRP-2 (Eberle, Wagner *et al.*, 1998).

Foram realizadas diversas estratégias de tratamento para indução da produção de feomelanina, na tentativa de modular a atividade da tirosinase ou favorecer a feomelanogênese pela disponibilidade de precursores. Isso foi necessário porque há pouca informação sobre como essa modulação pode ser realizada *in vitro*, sem utilização da proteína ASIP. Cabe salientar que foi realizada uma tentativa de adquirir o plasmídeo codificante para ASIP; o Dr. Vicent Hearing, dos EUA, concordou em doá-lo para essa pesquisa, entretanto, o referido plasmídeo não atendeu às normas da Anvisa para importação. Sendo assim, não foi possível usar este material. Desta forma, foram testados alguns tratamentos das células com base em alguns trabalhos que relatam condições em que há um aumento da produção de feomelanina, como sumarizado na tabela 9.

Tratamento	Comentários / Referências
<b>PTU 0,2 mM</b>	<p>A feniltiouréia (PTU) é um inibidor da tirosinase, por induzir a degradação da mesma após a maturação no complexo de Golgi (Hall e Orlow, 2005).</p> <p>Le Pape e colaboradores (2008) mostraram que quando células de melanócitos murinos (linhagem Melan-a) foram tratadas com 0,2 mM de PTU por 4 dias, houve diminuição do conteúdo de eumelanina celular, enquanto a os níveis de feomelanina foram mantidos (houve aumento da razão feo/eumelanina).</p>
<b>Ácido Kójico 0,2 mM</b>	<p>Como a produção de feomelanina é associada com baixa atividade da enzima tirosinase (Land e Riley, 2000), outro inibidor da atividade da tirosinase também foi utilizado, o ácido kójico, que atua como quelante de metais de transição, como o cobre do sítio ativo da tirosinase (Kim e Uyama, 2005).</p>
<b>Tirosina 0,2 mM</b>	<p>Smit e colaboradores (2008) observaram que, quando determinados melanócitos extraídos de biópsias de doadores eram tratados com 0,2 mM de tirosina, havia aumento de feomelanogênese. Por outro lado, este mesmo tratamento foi capaz de aumentar a produção de eumelanina em outras amostras.</p>
<b>NH<sub>4</sub>Cl 10 mM + Tirosina 0,2 mM</b>	<p>O tratamento de melanócitos com cloreto de amônio e tirosina altera o pH dos melanossomos e favorece a via eumelanogênica (Ancans, 2001).</p>
<b>L-DOPA 0,2 mM</b>	<p>Quando melanócitos TM10, derivados de camundongos C57BL, foram tratados com L-DOPA 0,2 mM por 72 h, houve aumento da produção de feomelanina, mas não de eumelanina (Sato, Ito <i>et al.</i>, 1987).</p>
<b>Tirosina 0,2 mM + Cisteína 0,2 mM</b>	<p>É descrito que, quando melanócitos da linhagem M9401 são cultivadas continuamente com suplementação de tirosina 0,2 mM e cisteína 0,2 mM, há aumento do conteúdo de feomelanina (Smit, Van Der Meulen <i>et al.</i>, 1997).</p>

TABELA 9: RESUMO DAS CONDIÇÕES DE TRATAMENTO DAS CÉLULAS, JÁ DESCRITAS NA LITERATURA, ONDE HOUVE AUMENTO DA FEOMELANOGENESE.

FONTE: o autor (2012).

Desta forma, foram feitas diversas combinações entre os tratamentos descritos na literatura para estímulo da feomelanogênese. As células foram plaqueadas e tratadas com 0,2 mM de tirosina; 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM DOPA; 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM tirosina; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM ácido kójico; 0,2 mM ácido kójico + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína, todos solubilizados em meio RPMI contendo 10 % de SFB. O meio de cultivo foi trocado todos os dias e, após 96 h, procedeu-se com a quantificação da feomelanina intracelular, cujo resultado é mostrado na figura 33.

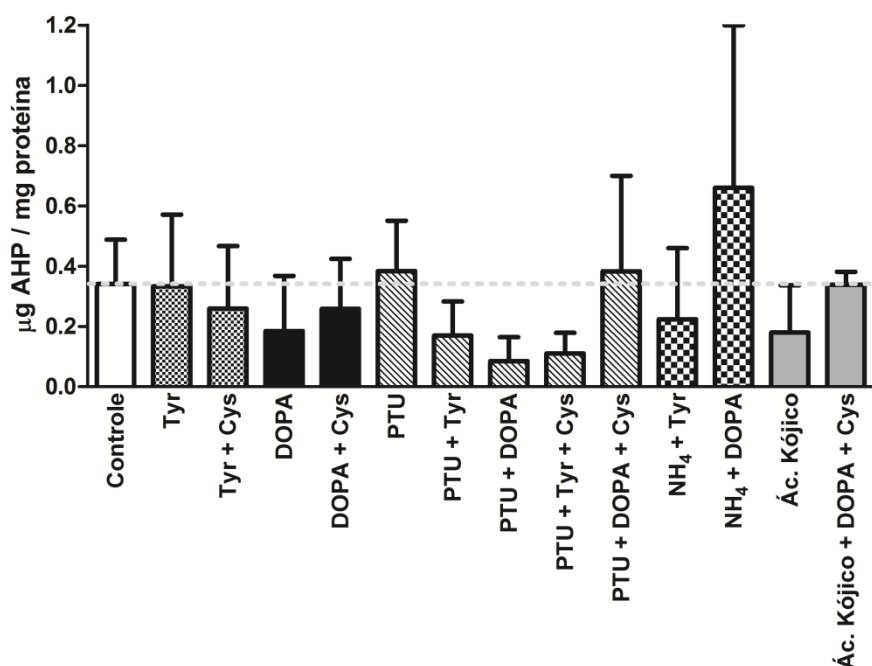


FIGURA 33: QUANTIFICAÇÃO DA FEOMELANINA INTRACELULAR APÓS TRATAMENTOS PARA INDUÇÃO DA FEOMELANOGENESE.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células de melanoma humano da linhagem SK-Mel23 foram plaqueadas e tratadas com precursores da via melanogênica ou moduladores da melanogênese (0,2 mM de tirosina; 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM DOPA; 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM PTU + 0,2 mM tirosina + 0,2 mM cisteína; 0,2 mM PTU + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM tirosina; 10 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 0,2 mM DOPA; 0,2 mM ácido kójico; 0,2 mM ácido kójico + 0,2 mM DOPA + 0,2 mM cisteína) por 96 h. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de 4 experimentos independentes.

Como pode ser observado na figura acima, os tratamentos utilizados não foram eficazes em estimular a feomelanogênese na linhagem SK-Mel23, sendo que o tratamento  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + L-DOPA aparentou ser o mais promissor, entretanto, de baixa reprodutibilidade. Além disso, quando a viabilidade celular após os tratamentos foi avaliada, observou-se que este mesmo tratamento foi capaz de reduzir em cerca de 35 % a viabilidade celular (Figura 34).

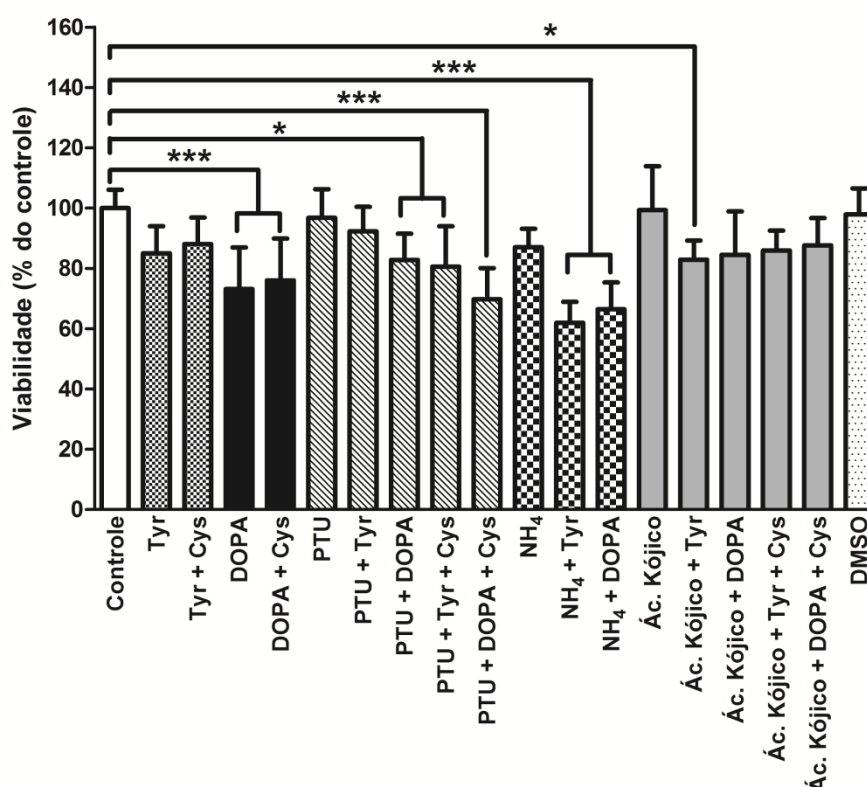


FIGURA 34: VIABILIDADE CELULAR APÓS TRATAMENTO DAS CÉLULAS DE MELANOMA PARA INDUÇÃO DE FEOMELANOGÊNESE.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A viabilidade celular após tratamento com precursores da via feomelanogênica e outros moduladores da atividade da tirosinase (mesmas condições descritas na figura 33) foi avaliada após 96 h pelo método do MTT. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes, feitos em triplicata. \* $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação ao grupo controle.

Recentemente, foi demonstrado que o estímulo da melanogênese em células B16-F10 pelo tratamento com tirosina e cloreto de amônio leva à parada do ciclo celular, devido à entrada das células no estado de quiescência (Cunha, Kawahara *et al.*, 2012). A diminuição da viabilidade celular da linhagem SK-Mel23 após o tratamento para indução da feomelanogênese pode ter causa semelhante.

Tendo em vista a baixa eficácia quanto ao estímulo da feomelanogênese para a linhagem SK-Mel23 e a concomitante perda de viabilidade celular para alguns tratamentos, optou-se por utilizar linhagens de melanoma humano que poderiam apresentar diferenças no conteúdo de feomelanina celular, sem necessidade de estímulo. Neste contexto, estavam disponíveis as linhagens WM9, WM35 e 1205Lu, que foram utilizadas nos demais experimentos descritos neste trabalho.

### 5.2.3 Avaliação dos níveis de feomelanina celular nas linhagens WM9, WM35 e 1205Lu.

De nosso conhecimento, não havia estudos onde os níveis de feomelanina das linhagens WM9, WM35 e 1205Lu tivessem sido medidos, embora todas elas sejam descritas como sendo amelanóticas (Hsu, Elder *et al.*, 2002).

A avaliação visual dos *pellets* formados após centrifugação das células mostra uma discreta coloração amarelada da linhagem WM35, quando comparada às linhagens WM9 e 1205Lu (Figura 35 A). Entretanto, quando foi realizada a dosagem de melanina total (método espectrofotométrico), não foi observada diferença significativa entre as linhagens (Figura 35 B). Embora este método tenha sido utilizado com sucesso em condições onde a produção de (eu)melanina varia em, pelo menos, 2 vezes (Kvam e Tyrrell, 1999; Hoogduijn, Cemeli *et al.*, 2004; Cunha, Kawahara *et al.*, 2012), o mesmo não foi efetivo para distinguir níveis basais de melanina, possivelmente devido à sua baixa sensibilidade. O ideal, neste caso, seria realizar a quantificação de eumelanina por um método mais sensível, por exemplo, por HPLC, após degradação da eumelanina pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em meio alcalino. Entretanto, devido às dificuldades que este método apresenta (síntese do padrão, instabilidade do padrão, reprodutibilidade do método, etc), optou-se por priorizar a avaliação do conteúdo de feomelanina. De qualquer maneira, fica claro que, mesmo que a produção de melanina não seja equivalente entre as 3 linhagens, a possibilidade de grande produção de (eu)melanina por alguma das 3 linhagens fica afastada.



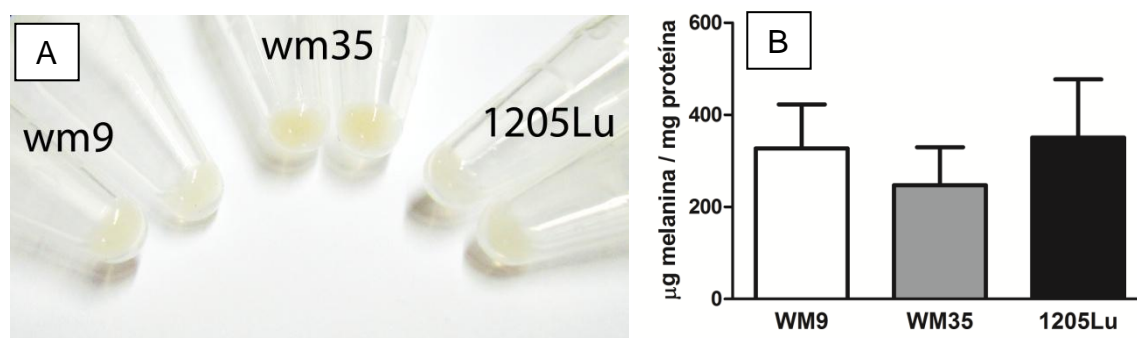


FIGURA 35: COMPARAÇÃO VISUAL E QUANTITATIVA DOS NÍVEIS TOTAIS DE MELANINA DAS LINHAGENS WM9, WM35 E 1205Lu.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A) A observação dos *pellets* formados após centrifugação das células revela uma discreta coloração amarelada da linhagem WM35, quando comparada às demais linhagens. B) A dosagem de melanina total não revelou diferença significativa entre as linhagens WM9 (barra branca), WM35 (barra cinza) e 1205Lu (barra preta).

Para verificar se as linhagens diferiam na quantidade de feomelanina, foi utilizado o método de hidrólise iodídrica, seguido pela quantificação dos produtos de hidrólise por HPLC. Como mostrado na figura 36, observa-se a presença de feomelanina nas células da linhagem WM35 (em torno de  $4 \mu\text{g}$  de AHP por  $10^7$  células), enquanto não foram detectados níveis de feomelanina nas demais linhagens (para WM9 e 1205Lu, não foi possível detectar quaisquer sinais referentes ao AHP).

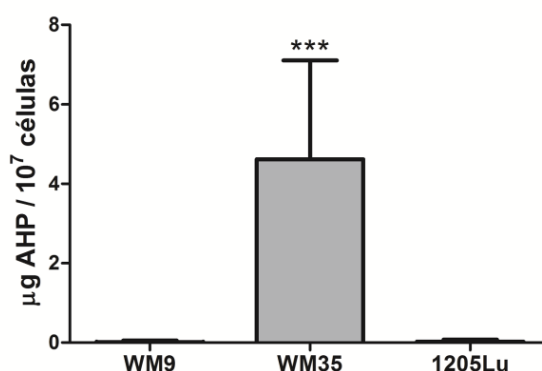


FIGURA 36: QUANTIFICAÇÃO DA FEOMELANINA CELULAR ATRAVÉS DA DOSAGEM DE AHP.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células de melanoma humano WM35 apresentaram níveis significativamente maiores de feomelanina, em relação às linhagens WM9 e 1205Lu.  $n = 5$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , em relação às demais linhagens celulares.

Desta forma, a linhagem WM35 foi utilizada como modelo de linhagem produtora de feomelanina, enquanto as demais foram utilizadas como modelo de linhagens amelanóticas, a fim de comparação.

#### 5.2.4 Internalização celular do fotossensibilizador Rosa Bengala Acetato (RBAc)

Como alternativa de gerador de  $^1\text{O}_2$ , foi utilizada a forma acetilada do fotossensibilizador aniônico Rosa Bengala. O Rosa Bengala, quando excitado por luz com comprimento de onda entre 450 e 580 nm, pode transferir sua energia ao oxigênio molecular dissolvido no meio aquoso, gerando, assim, o  $^1\text{O}_2$  (Kochevar e Redmond, 2000). A acetilação deste fotossensibilizador aumenta seu caráter hidrofóbico, aumentando a captação celular do composto em até 10 vezes, quando comparado à forma não acetilada (Bottiroli, Croce *et al.*, 1997). Além disso, quando acetilado, o corante perde suas propriedades de fluoróforo e fotossensibilizador, que são restauradas após sofrer clivagem por esterases intracelulares. Novamente em sua forma não acetilada, há redução de sua permeabilidade pela membrana plasmática, levando à redução do efluxo da droga e consequente acúmulo no interior da célula (Bottiroli, Croce *et al.*, 1997).

Após a realização da síntese, conforme descrito em 4.23, foi verificado se o RBAc era internalizado pelas células, conforme descrito em 4.25. Como pode ser observado na figura 37 A, houve um aumento da fluorescência na fração celular de forma dose e tempo-dependente, atingindo um *plateau* após 120 min. Este aumento não foi observado no sobrenadante (Figura 37 B). Estes resultados mostram que o RBAc, conforme o esperado, é internalizado pelas células e restaurado à sua forma não-acetilada, mas, após a clivagem, nenhum ou pouco Rosa Bengala sai da célula. Para os posteriores experimentos, foi escolhido o período de 2 h de incubação das células na presença do RBAc, antes de irradiá-las.

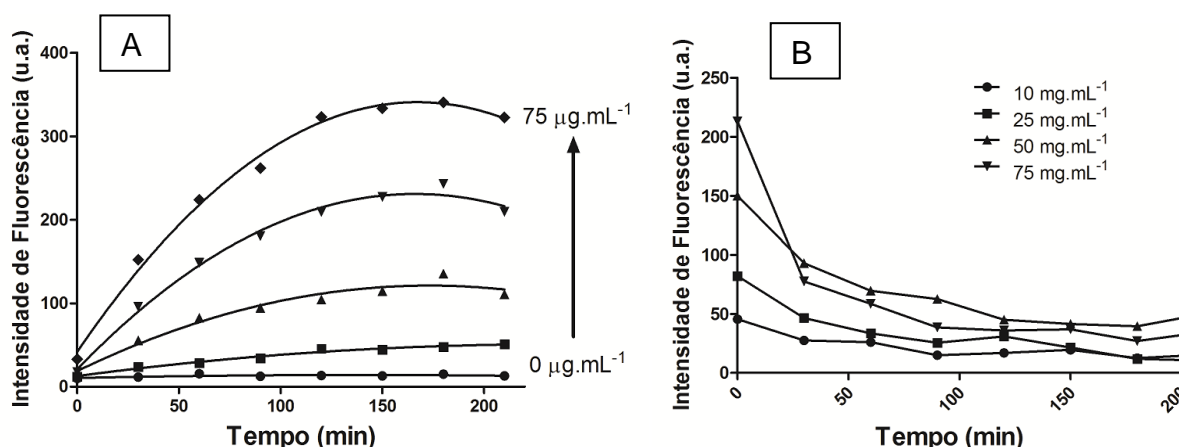


FIGURA 37: INTERNALIZAÇÃO E DESACETILAÇÃO DO RBAC PELAS CÉLULAS.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: (A) A internalização e a conversão do RBAC à forma não-acetilada fluorescente mostrou-se ser tempo e dose-dependentes, atingindo o *plateau* após 120 min de incubação. (B) De forma contrária, não foi observado aumento da fluorescência no sobrenadante celular, indicando que não há efluxo de Rosa Bengala durante o intervalo de tempo analisado. *u.a.*: unidades arbitrárias.

### 5.2.5 Viabilidade celular após a irradiação na presença de RBAC

O próximo passo foi a avaliação da viabilidade celular após o tratamento com <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, utilizando o RBAC e a câmara de irradiação para geração do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Para a avaliação da viabilidade celular após tratamento das células com o RBAC e exposição à irradiação, foram utilizados dois métodos distintos: o do MTT e o do cristal violeta. Nestes ensaios, foi analisada a viabilidade celular imediatamente após a irradiação e também 18 h após o término da irradiação. Os respectivos grupos controle (com RBAC / escuro e sem RBAC / irradiado) foram realizados.

Primeiramente, com relação aos dados obtidos imediatamente após a irradiação, observou-se que o RBAC, na ausência de irradiação, não apresentou citotoxicidade até a concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup>, por nenhum dos métodos utilizados e para nenhuma das 3 linhagens (Figura 38). Entretanto, após irradiação, foi observado que, pelo método do MTT, houve redução significativa da viabilidade nas maiores doses utilizadas (25 e 50 µg.mL<sup>-1</sup>), para todas as linhagens. O mesmo efeito não foi observado quando a viabilidade foi avaliada pelo método do cristal violeta: não foi observada redução da viabilidade para nenhuma das doses utilizadas (Figura 38). Essa diferença dos resultados obtidos pelos 2 métodos pode ser devido às

diferenças dos princípios nos quais cada um se baseia. O método do MTT, como já descrito anteriormente, associa a viabilidade celular à atividade de enzimas mitocondriais, enquanto o método do cristal violeta reflete a quantidade de células que permanecem aderidas à superfície de cultivo. Levando em consideração que o RBAC leva à lesão em diversas organelas celulares, inclusive a mitocôndria (Bottone, Soldani *et al.*, 2006; Soldani, Croce *et al.*, 2007) e que os mecanismos de morte envolvidos neste sistema são a autofagia (Dini, Inguscio *et al.*, 2010) e a apoptose, cujo pico, para esta última, acontece 12 h após o término da irradiação (Panzarini, Tenuzzo *et al.*, 2009), é possível que, neste momento, tenha havido um dano mitocondrial sem, no entanto, ter havido o desprendimento das células. Esta situação justificaria a diferença da taxa de viabilidade celular encontrada entre os dois métodos.

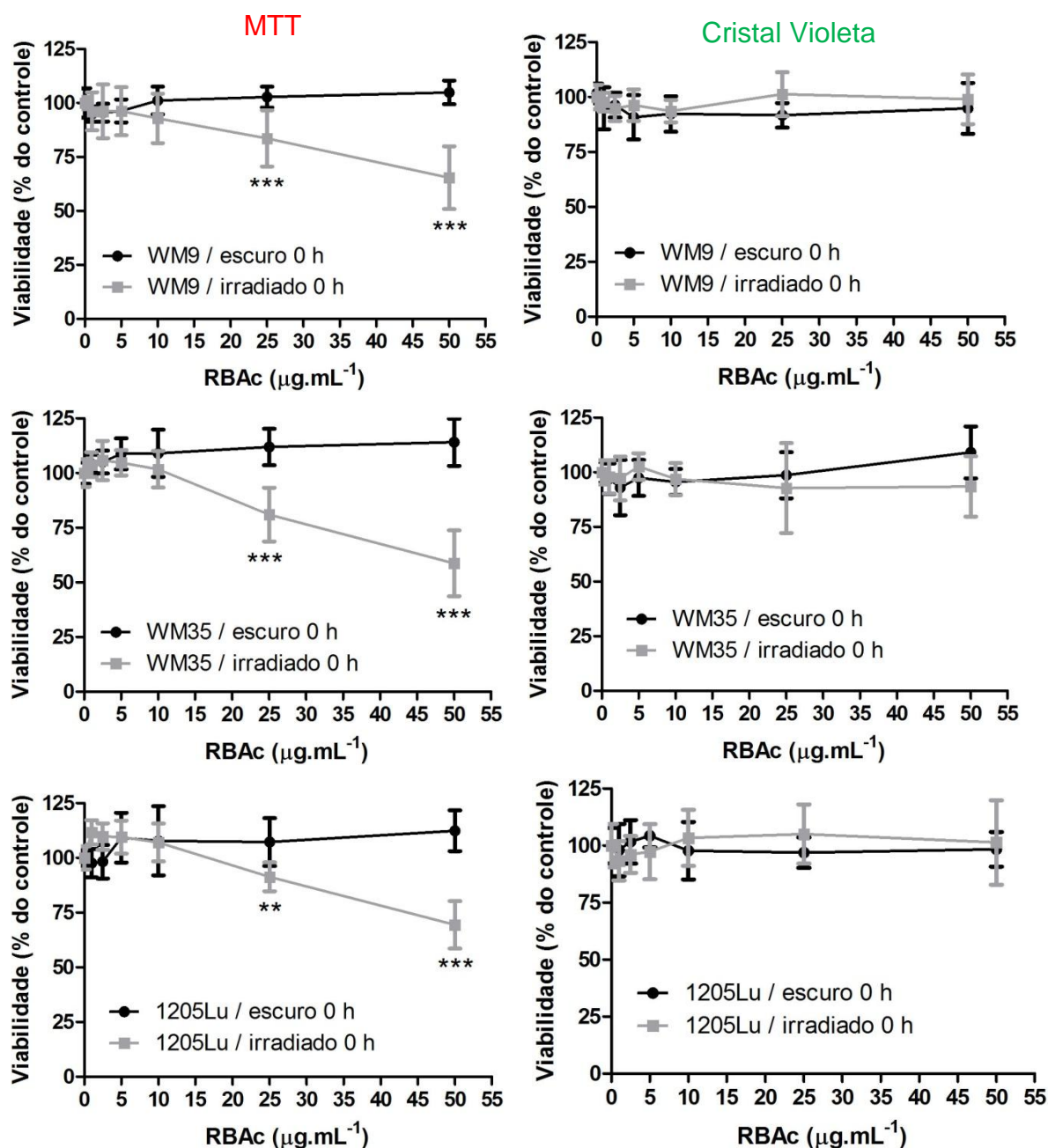


FIGURA 38: VIABILIDADE CELULAR IMEDIATAMENTE APÓS O TÉRMINO DA IRRADIAÇÃO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células ( $2 \times 10^4$  células / poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram incubadas na presença de 0 a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de RBac, por 2 h. Em seguida, o meio foi retirado, substituído por HBSS e as células foram irradiadas por 15 min. A viabilidade celular foi avaliada imediatamente após o término da irradiação, por 2 métodos distintos: MTT e cristal violeta. Linhas pretas: células mantidas no escuro; linhas cinzas: células irradiadas. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Observa-se também que, para as condições utilizadas, não foram observadas diferenças entre as 3 linhagens celulares (Figura 39), indicando que todas as linhagens foram igualmente sensíveis ao tratamento pelo  $^1\text{O}_2$ .

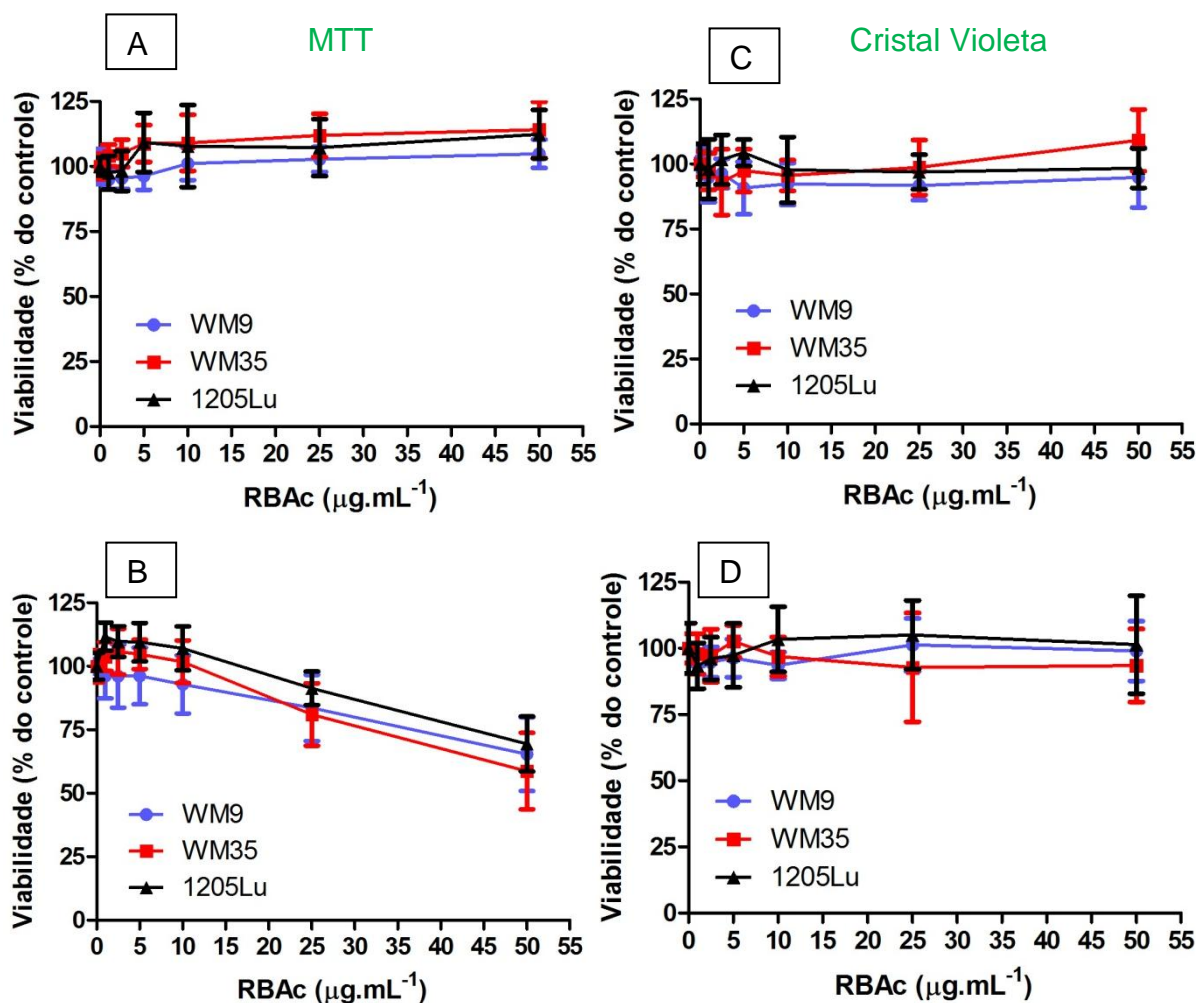


FIGURA 39: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DAS 3 LINHAGENS IMEDIATAMENTE APÓS A EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os dados de viabilidade obtidos das 3 linhagens imediatamente após irradiação, pelos 2 métodos diferentes, foram comparados. A) Avaliação pelo método do MTT, na ausência de irradiação; B) avaliação pelo método do MTT, imediatamente após irradiação; C) avaliação pelo método do cristal violeta, na ausência de irradiação; D) avaliação pelo método do cristal violeta, imediatamente após irradiação.

Quando a viabilidade celular foi avaliada 18 h após o término da irradiação, uma drástica redução da viabilidade foi observada (Figura 40), chegando à perda total de viabilidade nas maiores doses utilizadas, quando avaliado pelo método do

MTT. Neste caso, os perfis observados em ambos os métodos foram semelhantes, mas, de forma geral, a redução da viabilidade observada pelo método do MTT foi maior do que pelo método do cristal violeta. Já o RBAC sozinho e a irradiação na ausência de RBAC não mostraram citotoxicidade (Figura 40).

Assim como descrito por outros autores (Soldani, Croce *et al.*, 2007; Panzarini, Tenuzzo *et al.*, 2009; Dini, Inguscio *et al.*, 2010), esses dados sugerem que pode estar ocorrendo a indução de morte via apoptose, que se inicia pelo dano mitocondrial (como observado pela menor atividade da desidrogenase mitocondrial no tempo 0 h) e, tardiamente, evolui para perda de adesão destas células à superfície.

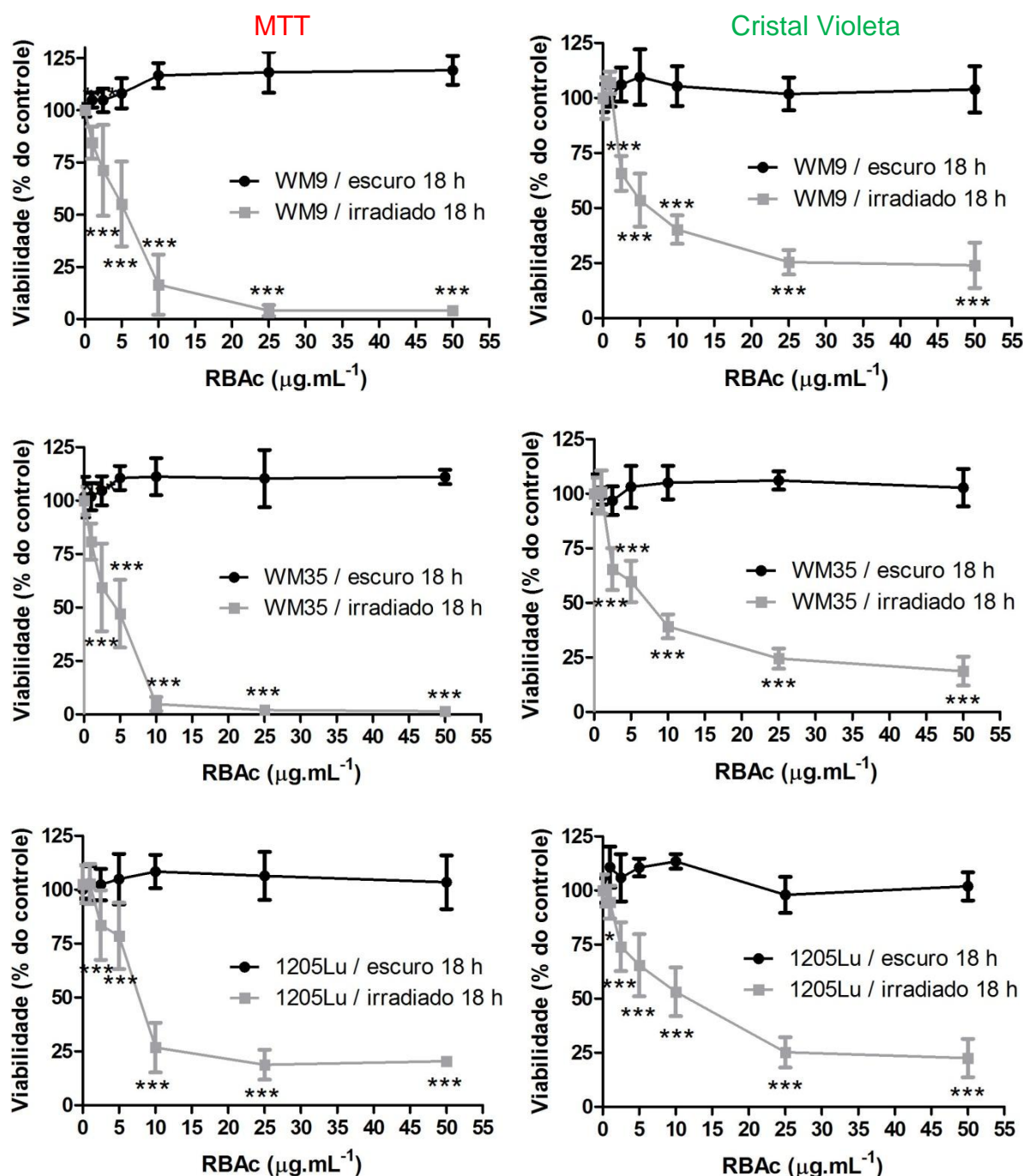


FIGURA 40: VIABILIDADE CELULAR 18 h APÓS O TÉRMINO DA IRRADIAÇÃO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células ( $2 \times 10^4$  células / poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram incubadas na presença de 0 a  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de RBAC, por 2 h. Em seguida, o meio foi retirado, substituído por HBSS e as células foram irradiadas por 15 min. A viabilidade celular foi avaliada 18 h após o término da irradiação, por 2 métodos distintos: MTT e cristal violeta. Linhas pretas: células mantidas no escuro; linhas cinzas: células irradiadas. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A comparação entre as curvas de viabilidade 18 h após a irradiação mostrou que, quando analisado pelo método do MTT, as células da linhagem 1205Lu foram



mais resistentes ao tratamento de irradiação + RBAC do que a linhagem WM35 (Figura 41 B). Não foram observadas diferenças entre as linhagens WM9 e WM35 ou entre as linhagens WM9 e 1205Lu. Quando a mesma condição foi analisada pelo método do cristal violeta, o perfil foi diferente, pois a maior diferença foi observada entre as linhagens WM9 e 1205Lu (Figura 41 D), não sendo observadas diferenças entre as linhagens WM9 e WM35 ou WM35 e 1205Lu. De qualquer maneira, a linhagem 1205Lu sempre se mostrou mais resistente ao tratamento aqui empregado e esta característica, aparentemente, deve estar relacionada à outros fatores que não ao seu baixo conteúdo de feomelanina, uma vez que não foi observada nenhuma tendência a proteção ou susceptibilidade das células que esteja relacionada ao conteúdo de feomelanina celular. Este resultado é interessante do ponto de vista do tratamento do melanoma pela PDT, uma vez que se relaciona a baixa eficácia da PDT em melanomas à ação fotoprotetora das melaninas (Davids e Kleemann, 2010) e ao seu potencial *scavenger* (Rozanowska, Sarna *et al.*, 1999). Desta forma, fica claro que pequenas quantidades de feomelanina celular não são capazes de alterar a susceptibilidade das células de melanoma à ação do  $^1\text{O}_2$ .

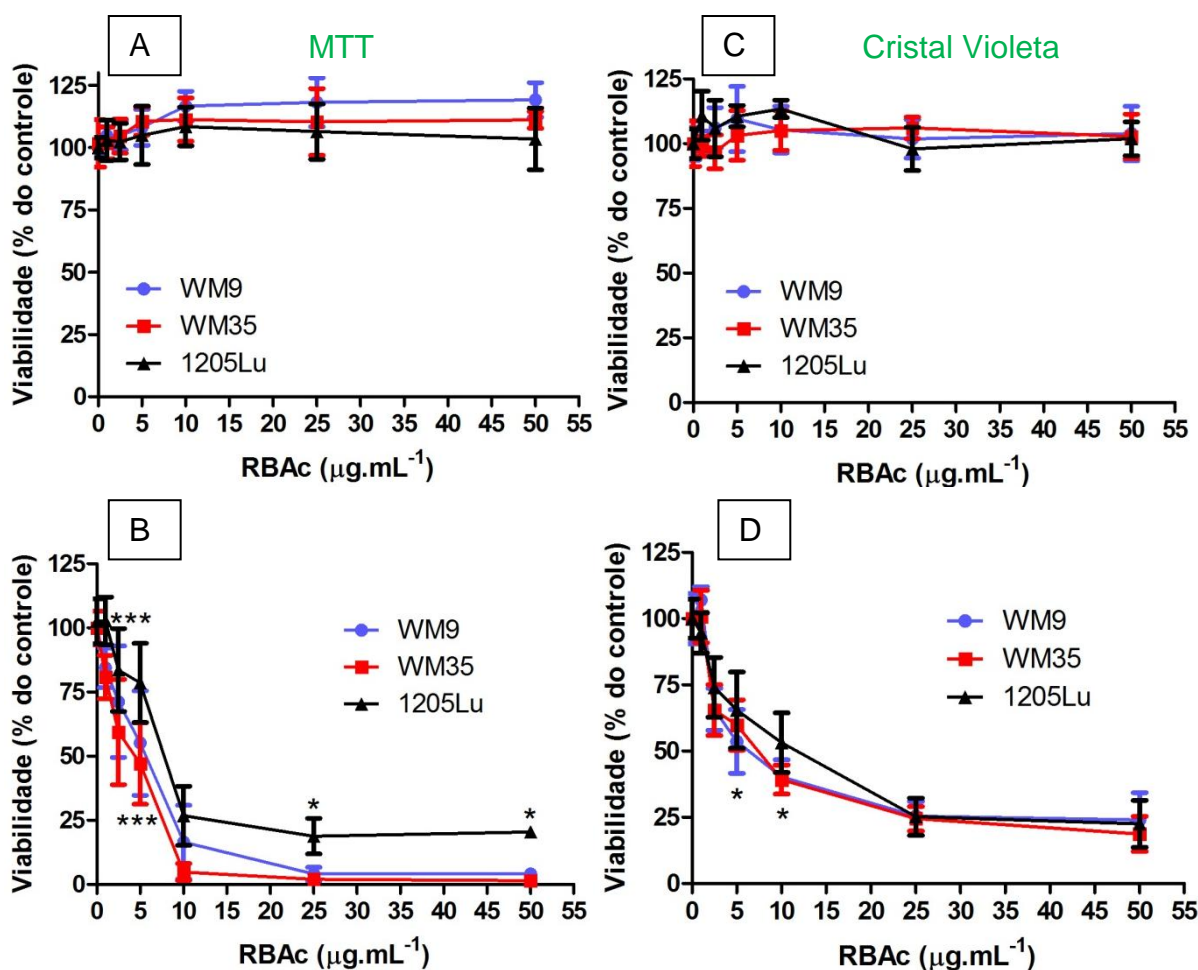


FIGURA 41: COMPARAÇÃO ENTRE A VIABILIDADE CELULAR DAS 3 LINHAGENS 18 h APÓS A EXPOSIÇÃO À IRRADIAÇÃO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os dados de viabilidade obtidos das 3 linhagens 18 h após irradiação, pelos 2 métodos diferentes, foram comparados. A) Avaliação pelo método do MTT, na ausência de irradiação; B) avaliação pelo método do MTT, 18 h após irradiação. Foram observadas diferenças apenas entre as linhagens WM35 e 1205Lu nas doses de 1, 5, 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; C) avaliação pelo método do cristal violeta, na ausência de irradiação; D) avaliação pelo método do cristal violeta, 18 h após irradiação. Foram observadas diferenças apenas entre as linhagens WM9 e 1205Lu nas doses de 1, 5 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Levando em consideração os dados de viabilidade aqui obtidos, foi escolhida a dose de 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de RBAC para os posteriores experimentos, uma vez que, após 18 h do tratamento, cerca de 80 % de viabilidade celular ainda era mantida para todas as linhagens, o que representou uma boa população de células para se realizar as posteriores dosagens.

### 5.2.6 Avaliação dos níveis de $^1\text{O}_2$ formados pela irradiação com o Rosa Bengala

Após a escolha da dose de RBAC que seria utilizada para os posteriores experimentos, tornou-se adequado estimar a quantidade de  $^1\text{O}_2$  que estava sendo formado sob as condições aqui empregadas (ou seja, a utilização de  $2\ \mu\text{g.mL}^{-1}$  de Rosa Bengala como fotossensibilizador e a dose de irradiação fornecida pelo aparato construído). Para isso, foi utilizado o método do consumo do FFA pelo  $^1\text{O}_2$ , no qual se pode acessar o decaimento do pico do FFA, enquanto se observa a formação de seus produtos por HPLC. Neste experimento, foi utilizada uma concentração de Rosa Bengala ( $1,89\ \mu\text{M}$ ) equivalente à dose de RBAC utilizada em células ( $2\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Isso foi necessário porque, como já discutido anteriormente, a acetilação do Rosa Bengala acarreta a perda de suas propriedades de fotossensibilizador. Desta forma, neste experimento, considera-se que 100 % do RBAC adicionado às células foi desesterificado e transformado em Rosa Bengala. Embora este método não seja completamente fiel às condições celulares, pois a concentração de  $^1\text{O}_2$  formada intracelularmente depende de fatores como volume celular e localização celular do fotossensibilizador, ele pode fornecer uma estimativa da ordem de produção de  $^1\text{O}_2$  em condições ótimas e sem interferências de *quenchers* celulares de  $^1\text{O}_2$ , como, por exemplo, proteínas.

Como pode ser observado na figura 42 A, o consumo do FFA, com concomitante formação de seus produtos de oxidação, é dependente do tempo de irradiação empregado, o que reflete na diminuição da área do pico do FFA e no aumento da área do pico dos produtos. Na ausência de Rosa Bengala, não há consumo de FFA, o que confirma a participação do  $^1\text{O}_2$  neste processo (Figura 42 B).

Para estimativa da quantidade de  $^1\text{O}_2$  formado pela irradiação na presença do Rosa Bengala, foi calculada a quantidade de FFA consumida no decorrer do tempo. Observou-se que, em 15 min,  $0,195\ \text{mM}$  de FFA havia sido consumido (Figura 42 C). Considerando-se que foi empregada uma concentração de FFA próxima ao seu valor  $\beta$  (que é a concentração necessária de captador para reagir com 50 % do  $^1\text{O}_2$  presente; Haag, Hoiné *et al.*, 1984 ), observa-se que a produção total de  $^1\text{O}_2$  no intervalo de tempo de irradiação das células foi da ordem de  $0,4\ \text{mM}$ ,

o que pode ser considerado um nível bastante baixo, já que outros estudos usando geradores químicos de  $^1\text{O}_2$  chegam aplicar o equivalente a 2 mM ou mais de  $^1\text{O}_2$  (Otsu, Sato *et al.*, 2005).

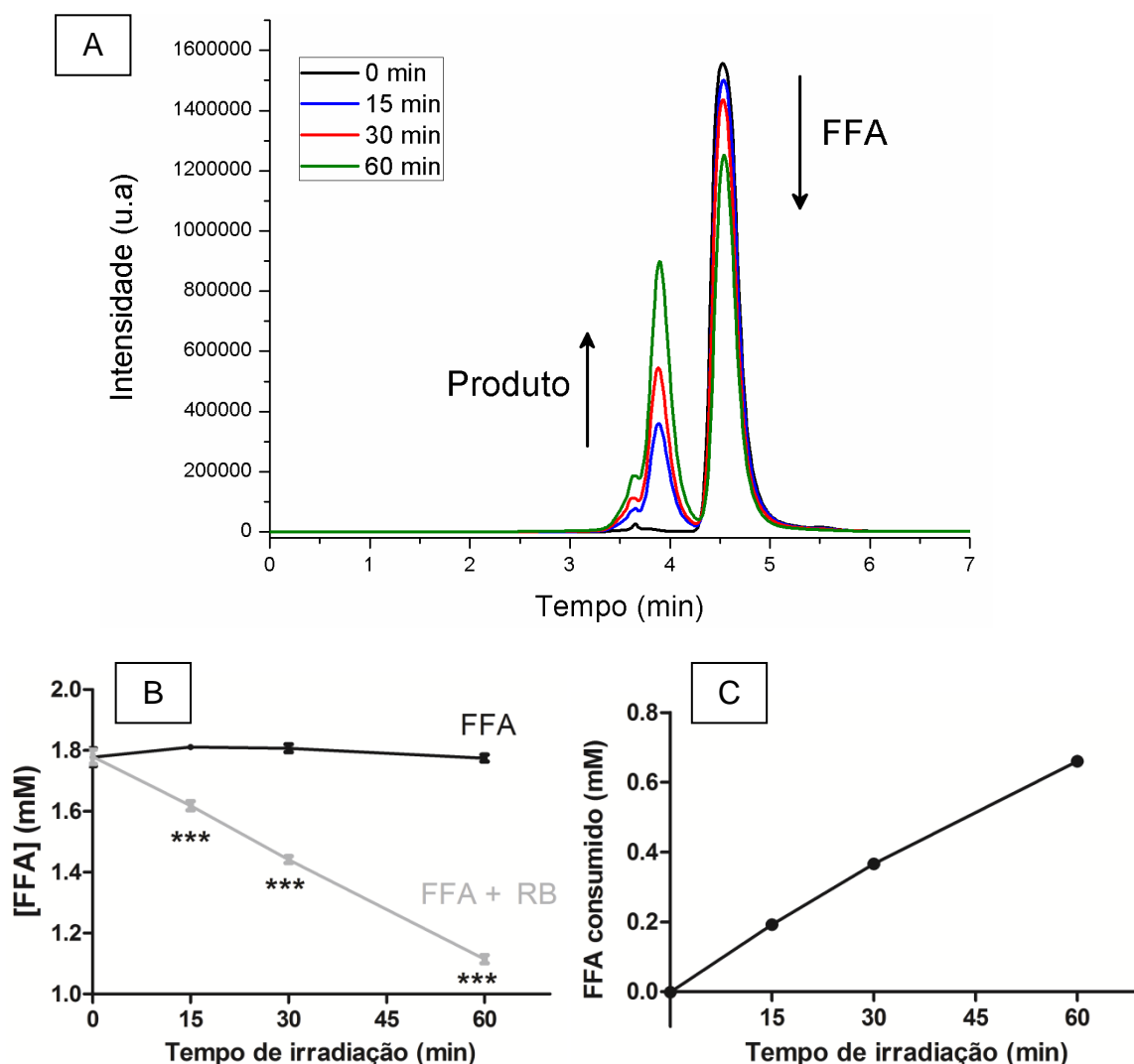


FIGURA 42: MEDIDA DA PRODUÇÃO DE  $^1\text{O}_2$  POR FOTOSSENSIBILIZAÇÃO, PELA UTILIZAÇÃO DO FFA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: O Rosa Bengala (RB,  $1,89 \mu\text{M}$ ), em concentração equivalente ao RBAC utilizado em células, foi diluído em PBS e irradiado por 0 a 60 min, na presença do captador FFA. O consumo de FFA e a geração de seu produto foram analisados por HPLC. A) Cromatograma representativo, demonstrando que, à medida que o FFA foi irradiado na presença de Rosa Bengala, houve diminuição da área do pico do FFA, com concomitante aumento do pico dos produtos de oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ , de forma tempo-dependente. B) A irradiação do FFA, na ausência de Rosa Bengala, não levou ao consumo de FFA (linha preta), enquanto que, quando o mesmo processo foi realizado na presença do fotossensibilizador RB, houve consumo do FFA, de forma tempo-dependente (linha cinza). C) A quantidade de FFA consumido foi proporcional ao tempo de irradiação, sendo que, em 15 min, cerca de 0,195 mM de FFA foi consumido; em 30 min, 0,366 mM de FFA foi consumido e em 60 min, 0,66 mM de FFA foi consumido. Os gráficos representam a média de 1 experimento realizado em triplicata.

### 5.2.7 Dosagem de glutathiona

Considerando que (a) a glutathiona constitui uma barreira importante contra EROS, (b) que a via de síntese de melanina produz  $H_2O_2$  e que (c) a via melanogênica é influenciada pelos níveis de glutathiona, os níveis basais deste composto foram quantificados nas 3 linhagens aqui estudadas.

Interessantemente, a linhagem WM35 apresentou os maiores níveis basais de glutathiona total (GSx), sendo 30 % maior do que os níveis encontrados na linhagem WM9 e 50 % do que na linhagem 1205Lu (Figura 43 A). Perfil semelhante foi observado com relação à expressão da enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase, a enzima limitante da via da síntese da glutathiona (Figura 43 B). Observou-se que a linhagem WM35 expressa cerca de 2 x mais  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase do que a linhagem WM9 e 3,5 x mais do que a linhagem 1205Lu. Este resultado pode ter relação com a maior produção de feomelanina observada para a linhagem WM35.

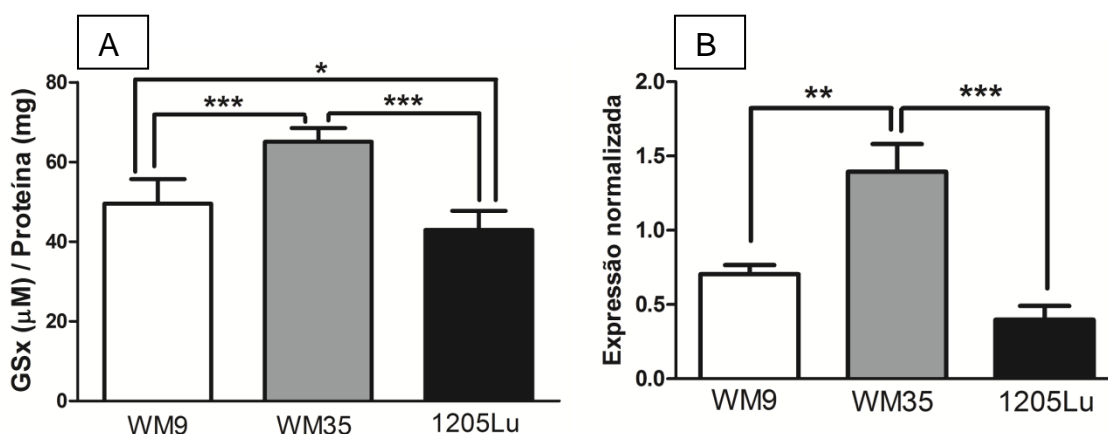


FIGURA 43: COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS BASAIS DE GLUTATIONA TOTAL E DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA  $\gamma$ -GLUTAMILCISTEÍNA LIGASE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: (A) Os níveis de glutathiona total (GSx) foram dosados nas 3 linhagens e expressos como concentração de GSx ( $\mu$ M) por mg de proteína. (B) Os níveis de expressão da enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase, normalizados pela expressão dos genes *hHMBS* e *hHPRT*, são mostrados para as 3 linhagens, WM9 (barra branca), WM35 (barra cinza) e 1205Lu (barra preta). Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

De fato, alguns trabalhos relacionam os níveis de glutathiona / tióis com a melanogênese. Já foi demonstrado que, quando a cisteína foi depletada no meio de cultivo, houve indução da eumelanogênese em células de melanoma humano (com concomitante aumento da atividade de tirosina hidroxilase), enquanto os níveis de

glutathiona intracelular foram reduzidos (Del Marmol, Ito *et al.*, 1996; Kinnaert, Duez *et al.*, 2004). Outros autores também relacionaram a quantidade de cisteína ou glutathiona no meio de cultivo com a atividade de tirosina hidroxilase, sendo que, aparentemente, há uma relação inversa entre os dois fatores (Jara, Aroca *et al.*, 1988): a privação de glutathiona tem efeito de promover a eumelanogênese (Del Marmol, Solano *et al.*, 1993). A glutathiona, inclusive, já foi utilizada por outros autores como inibidor da via melanogênica (Imokawa, 1989). Um transportador que medeia a troca de cistina e glutamato entre os meios intra- e extracelular, codificado pelo gene *Slc7a11*, foi apontado como o responsável pelo controle da melanogênese, sendo que, quando ausente, ocorre uma redução dos níveis de feomelanina intracelular, acompanhada por um aumento da síntese de eumelanina (Chintala, Li *et al.*, 2005).

Mais especificamente com relação à via feomelanogênica, nos trabalhos de Benathan (Benathan, 1996; Benathan e Labidi, 1996), observou-se que a formação de 5-S-cisteinildopa em células de melanoma humano não foi relacionada diretamente com a presença de glutathiona em si. A ligação entre as duas vias seria a disponibilidade de cistina no meio intracelular, uma vez que a síntese de 5-S-cisteinildopa foi favorecida quando a concentração de cistina foi aumentada e a atividade da  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase foi inibida pela L-butionina sulfoximina (BSO). O mesmo autor também descreveu que o tratamento com BSO exerce um efeito negativo sobre a atividade da enzima tirosinase (Benathan, 1997). Considerando-se que baixos níveis de atividade da enzima tirosinase favorecem a feomelanogênese (Land e Riley, 2000; Abdel-Malek, Knittel *et al.*, 2008), é possível que, sob estas condições, tenha havido um aumento do conteúdo de feomelanina intracelular. Em conjunto, estes estudos demonstram que a via feomelanogênica é altamente dependente dos níveis de tióis / cistina intracelulares.

Como mostrado na figura 43 A, maiores níveis de glutathiona foram encontrados na linhagem produtora de feomelanina, WM35, o que poderia indicar a maior disponibilidade de cistina livre nestas células. Infelizmente, não foram encontrados dados na literatura sobre a expressão do trocador de glutamato / cistina (codificado pelo gene *Slc7a11*) para as linhagens em questão. Mas, de certa forma, poderia-se inferir que a linhagem WM35 deve ter um maior aporte de cistina, uma

vez que ambas as vias (de síntese de feomelanina e de glutathione) estão mais favorecidas nesta linhagem. Adicionalmente, levando-se em consideração o trabalho de Mojamdar e colaboradores (1982), que demonstraram que a glutathione pode servir como fonte de enxofre para síntese de cisteinildopas, há possibilidade que a presença de níveis aumentados de glutathione é que esteja favorecendo a síntese de feomelanina.

Outra hipótese que poderia ser levantada é que, sendo a via melanogênica uma fonte de EROS (Smit, Van Nieuwpoort *et al.*, 2008; Munoz-Munoz, García-Molina *et al.*, 2009; Cunha, Kawahara *et al.*, 2012), os maiores níveis de glutathione poderiam ser uma resposta ao estresse oxidativo causado pela síntese de feomelanina. Desta forma, a relação causa-consequência permanece em aberto para esta linhagem, podendo ser investigada pela inibição da enzima  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase ou pela utilização de antioxidantes.

Para avaliar se as células de melanoma com diferentes conteúdos de feomelanina difeririam na resposta ao tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , os níveis de glutathione total foram quantificados após 0 e 18 h após a irradiação na presença de RBAC. Como pode ser observado na figura 44, não foram observadas alterações significativas dos níveis de glutathione imediatamente após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , para nenhuma das linhagens analisadas.



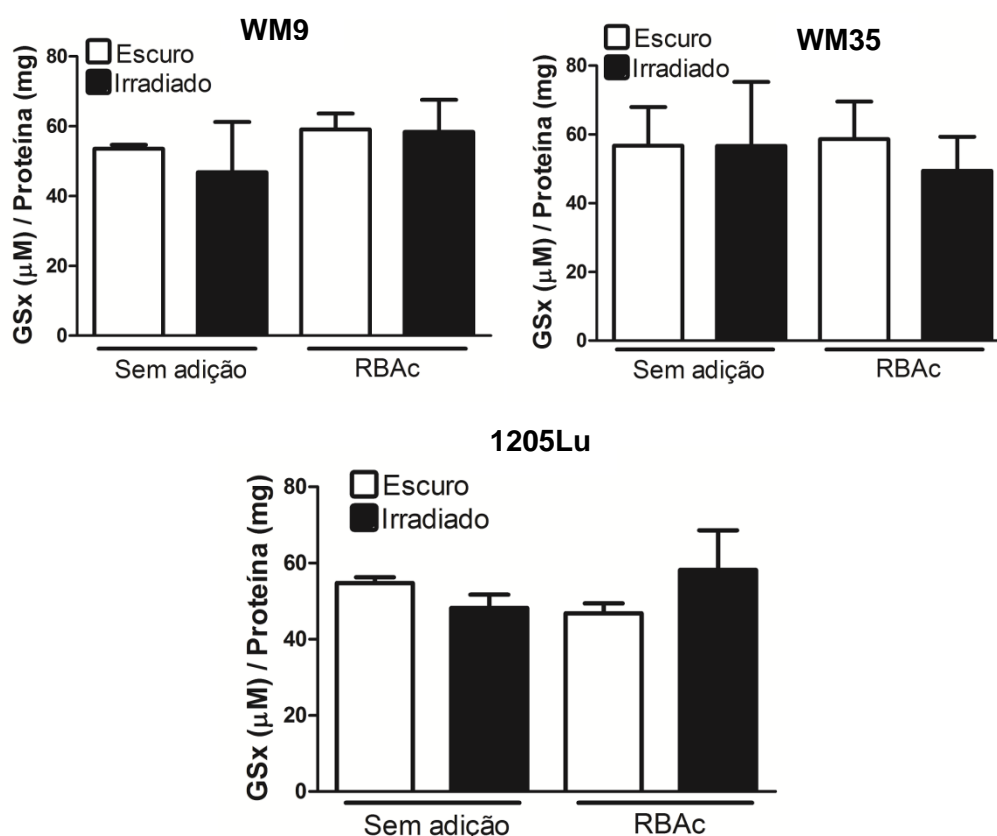


FIGURA 44: NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL (GSx) IMEDIATAMENTE APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os níveis de GSx foram quantificados nas 3 linhagens de células de melanoma imediatamente após o tratamento com RBAC e irradiação. As barras brancas representam as células que permaneceram no escuro e as barras pretas, as células que foram irradiadas. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de GSx entre os grupos.

O envolvimento da glutatona na resposta contra o  $^1\text{O}_2$  tem sido sugerido pelos dados presentes na literatura, pois o tratamento prévio de células HepG2 com BSO aumentou a sensibilidade destas células ao  $^1\text{O}_2$ , gerado através da decomposição de endoperóxidos (Otsu, Sato *et al.*, 2005). De forma equivalente, foi encontrado que a viabilidade de células de carcinoma epidermóide humano, previamente tratadas com BSO, foi menor em relação às células controle, 24 h após a fotossensibilização (Kiesslich, Plaetzer *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Jiang e colaboradores (2003), ao observarem o efeito sinérgico entre a PDT e a depleção de glutatona sobre a viabilidade celular,

inclusive em um modelo xenográfico, onde células de glioma humano foram injetadas em modelo murino.

Adicionalmente, já foi demonstrado também que a glutathione pode proteger as células contra o dano causado pelo  $^1\text{O}_2$ . O tratamento prévio de células de melanoma murino B16-F1 com glutathione preveniu a indução de apoptose nestas células após exposição ao  $^1\text{O}_2$ , por fotossensibilização com azul de metileno (Chen, Zheng *et al.*, 2008).

Nos resultados mostrados na figura 44, observa-se que não houve consumo de glutathione imediatamente após a irradiação. Embora este resultado não pareça estar em conformidade com os dados da literatura (onde se demonstra a importância da glutathione na defesa contra o  $^1\text{O}_2$ ), a ausência de depleção dos níveis de glutathione total não significa que esta não tenha sido importante na defesa contra o  $^1\text{O}_2$ , uma vez que, pelo método empregado, ambas (GSH e GSSG) são quantificadas em conjunto. De fato, seria mais apropriado fazer a medida de GSSG, concomitantemente com a de GSx. Entretanto, os níveis de GSSG em células de melanoma são bastante baixos, o que torna difícil a medida por métodos espectrofotométricos, como foi o caso. Mesmo após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , os níveis de GSSG ainda se encontravam abaixo do limite de detecção e isso pode ser devido à baixa produção de  $^1\text{O}_2$  pelo nosso sistema (0,4 mM, conforme mostrado no item 5.2.6), quando comparado com a usada por outros autores (2 mM, Otsu, Sato *et al.*, 2005).

A análise dos níveis de glutathione 18 h após a fotossensibilização demonstrou que houve um aumento dos níveis de GSx no grupo RBAC + irradiação, em todas as linhagens, sendo que o tratamento apenas com irradiação ou com RBAC não alterou os níveis de GSx em nenhuma das condições analisadas (Figura 45). O aumento dos níveis de glutathione foi mais expressivo na linhagem WM9 (cerca de 45 % de aumento), seguida pela linhagem 1205Lu (cerca de 38 % de aumento) e pela WM35 (cerca de 18 % de aumento). Corroborando com nossos dados, Bercht e colaboradores (2007) também observaram aumento dos níveis de glutathione quando fibroblastos humanos foram fotossensibilizados na presença de Ro19-8022, sendo que os autores descrevem que este aumento ocorre a partir de 10 h após a fotossensibilização e permanece por até cerca de 48 h.

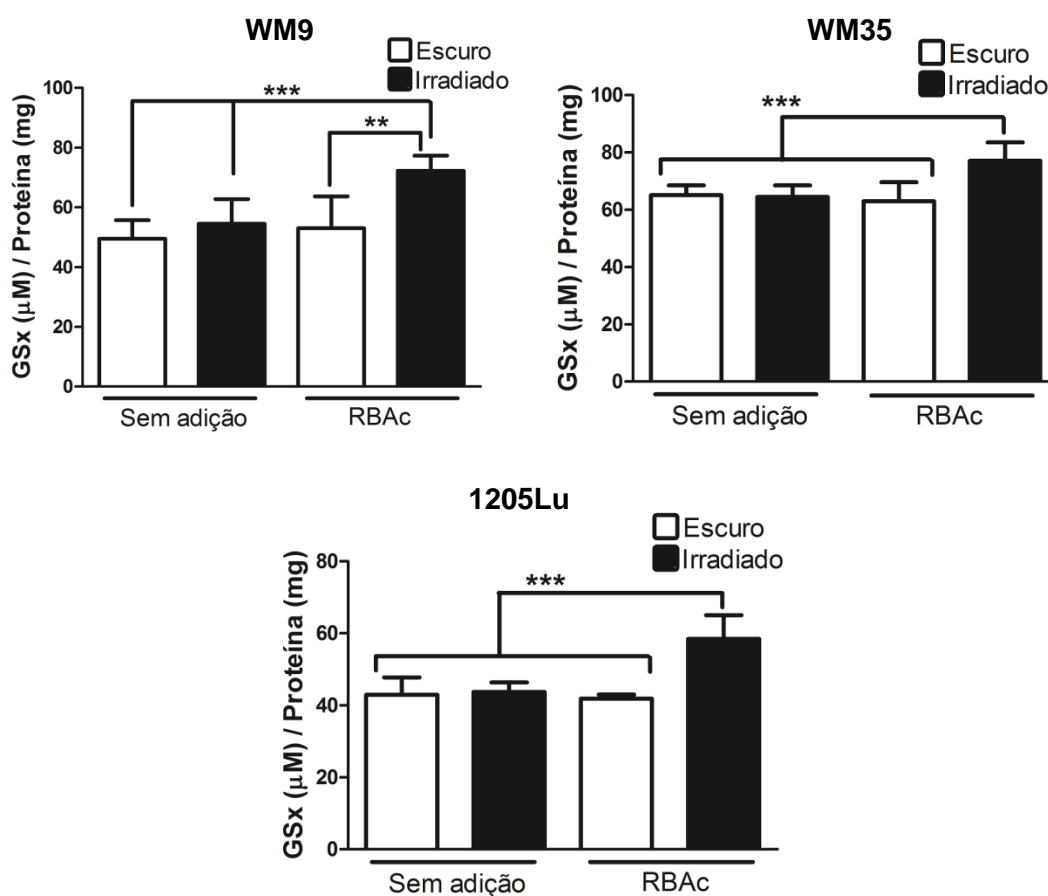


FIGURA 45: NÍVEIS DE GLUTATIONA TOTAL (GSx) 18 h APÓS O TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os níveis de GSx foram quantificados nas 3 linhagens de células de melanoma 18 h após o tratamento com RBAC e irradiação. As barras brancas representam as células que permaneceram no escuro e as barras pretas, as células que foram irradiadas. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Já foi demonstrado que a importância da glutatona contra os efeitos do  $^1\text{O}_2$  também pode ser indireta. A incubação de células J774A.1 (semelhantes a macrófagos murinos) com hidróperóxidos protéicos (possíveis produtos da oxidação de proteínas pelo  $^1\text{O}_2$ ) leva ao consumo de glutatona intracelular, com concomitante decomposição destes hidróperóxidos (Rahmanto, Morgan *et al.*, 2010a). Considerando que o consumo de glutatona após a PDT pode não ser um evento imediato (Magi, Ettore *et al.*, 2004), mas pode estar relacionado com a decomposição de produtos com longo tempo de meia-vida, originados pela oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ , como os hidróperóxidos (Rahmanto, Morgan *et al.*, 2010a) e que a resposta a este decréscimo dos níveis de glutatona é o estímulo da atividade de enzimas

relacionadas à regeneração da glutathiona, como a glutathiona redutase (Rahmanto, Morgan *et al.*, 2010b), uma possível explicação para os resultados é que a glutathiona pode ter sido consumida algumas horas após a irradiação. Este evento pode ter levado à ativação de vias relacionadas à recuperação dos níveis de glutathiona celular; dentre elas, possivelmente, a via de síntese de glutathiona. Assim, hipotetizou-se que o efeito observado 18 h após a irradiação (isto é, aumento dos níveis de glutathiona) poderia ser reflexo da resposta celular contra o consumo de glutathiona intracelular pelo tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , momentos após o término da irradiação.

Dessa forma, foi investigado se o aumento dos níveis de GSx era reflexo do aumento de expressão da enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase. Como pode ser observado na figura 46, não houve modulação desta enzima em nível de expressão gênica, o que não descarta a possibilidade de aumento de sua atividade. De fato, outros autores observaram alterações de atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathiona, sem haver modulação em nível de expressão. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Rahmanto e colaboradores (2010b), onde se observou que o tratamento das células J774A.1 com o fotossensibilizador Rosa Bengala e luz levou ao rápido decréscimo (entre 1 e 2 min) da glutathiona intracelular, com concomitante aumento da atividade, mas não de expressão, das enzimas glutathiona redutase e glutathiona peroxidase.

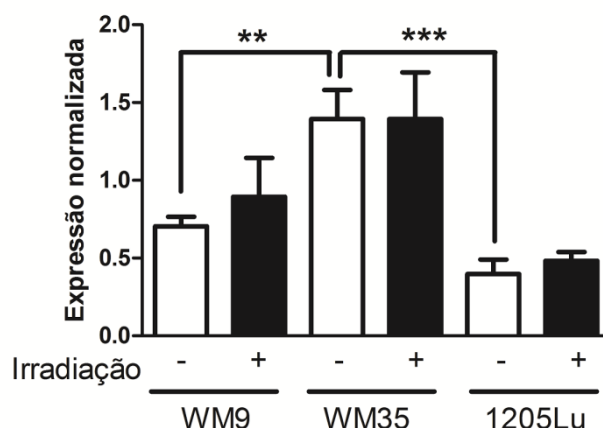


FIGURA 46: ANÁLISE DOS NÍVEIS DE mRNA DA ENZIMA  $\gamma$ -GLUTAMILCISTEÍNA LIGASE, 18 h APÓS O TRATAMENTO COM O  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os níveis de expressão da enzima  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase, normalizados pela expressão dos genes *hHMBS* e *hHPRT*, são mostrados para as 3 linhagens. As barras brancas representam as células controle, enquanto as barras pretas representam as células incubadas com o RBAC e irradiadas. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

Outra possibilidade para o aumento dos níveis de GSx seria a deglutationilação de proteínas (Hill e Bhatnagar, 2012); entretanto, essa hipótese requer uma investigação mais aprofundada com quantificação de proteínas S-glutationiladas e medida da atividade da glutaredoxina, sulfiredoxina e proteína disulfeto isomerase antes e depois da fotossensibilização. Outro aspecto a ser destacado é que, aparentemente, a linhagem WM35 seria a mais capacitada para produzir mais glutathione (devido aos seus maiores níveis de expressão de  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase; Figura 43 B), e não se observa maior aumento dos níveis de glutathione 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  nesta linhagem (Figura 45). Dessa forma, esses dados podem indicar a ocorrência de outros processos não relacionados à síntese de glutathione.

#### 5.2.8 Análise da expressão gênica de enzimas antioxidantes

Apesar das melaninas estarem intimamente relacionadas à geração de EROS, seja em sua via de síntese (Munoz-Munoz, Garcia-Molina *et al.*, 2009), pela autooxidação dos intermediários de síntese (Nappi e Vass, 1996) ou pela propriedade fotossensibilizadora (Korytowski, Pillas *et al.*, 1987), a relação entre a quantidade de

melanina e a expressão de enzimas antioxidantes foi pobremente explorada até o momento.

Uma relação entre a síntese de melanina e a atividade da catalase foi proposta por Maresca e colaboradores. Num primeiro estudo (Maresca, Flori *et al.*, 2008), estes autores demonstraram que a atividade da catalase era maior em melanócitos primários com maior quantidade de melanina. Interessantemente, quanto mais pigmentadas as células, menor foi a relação encontrada entre feomelanina e eumelanina, indicando que a coloração das células (e, logo, a atividade da catalase) se relaciona inversamente com a quantidade de feomelanina nelas contida. Num segundo trabalho (Maresca, Flori *et al.*, 2010), este mesmo grupo mostrou que, ao induzir as células de melanoma murino B16-F0 a produzir melanina pela ação do  $\alpha$ -MSH, houve aumento de expressão, de atividade e uma redistribuição celular da enzima catalase. Estes resultados fortalecem a hipótese da ligação entre a capacidade antioxidante enzimática celular e a quantidade de melanina.

Na análise da expressão gênica de algumas enzimas relacionadas com o sistema antioxidante celular, observou-se que a linhagem WM35 possuía os maiores níveis basais de expressão de SOD 1 (cerca de 2 x mais do que as demais linhagens), catalase (cerca de 2,5 x mais do que as demais linhagens) e glutathione redutase (aproximadamente 1,6 x mais do que as demais linhagens) (Figura 47). Os níveis de glutathione peroxidase foram semelhantes entre as linhagens WM35 e 1205Lu, sendo maiores do que na linhagem WM9 (em cerca de 2 x). Este perfil encontrado foi bastante interessante, no sentido de fortalecer a hipótese da maior geração de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  em células com maior conteúdo de (feo)melanina (indicado pela maior expressão de SOD, enzima que catalisa a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , pela maior expressão de catalase, que acelera a decomposição do  $H_2O_2$ , pela maior expressão da GPx, que utiliza a glutathione para remoção de peróxidos e pela maior expressão da GRed, que atua na redução do GSSG), que pode ocorrer por um efeito direto da melanina ou pelo processo da melanogênese, como sugerido por outros autores. Deve-se levar em consideração também que a sugerida maior produção de EROS em decorrência da (feo)melanogênese poderia ser mascarada pela maior expressão de enzimas antioxidantes (embora os níveis de mRNA não reflitam,

necessariamente, a atividade destas enzimas no contexto celular). Com relação à expressão de SOD 2 e peroxiredoxina 1, não foi observada relação com a quantidade de feomelanina de cada linhagem, embora a linhagem WM35 pareça expressar um pouco mais de peroxirredoxina 1 do que as demais linhagens (Figura 47).

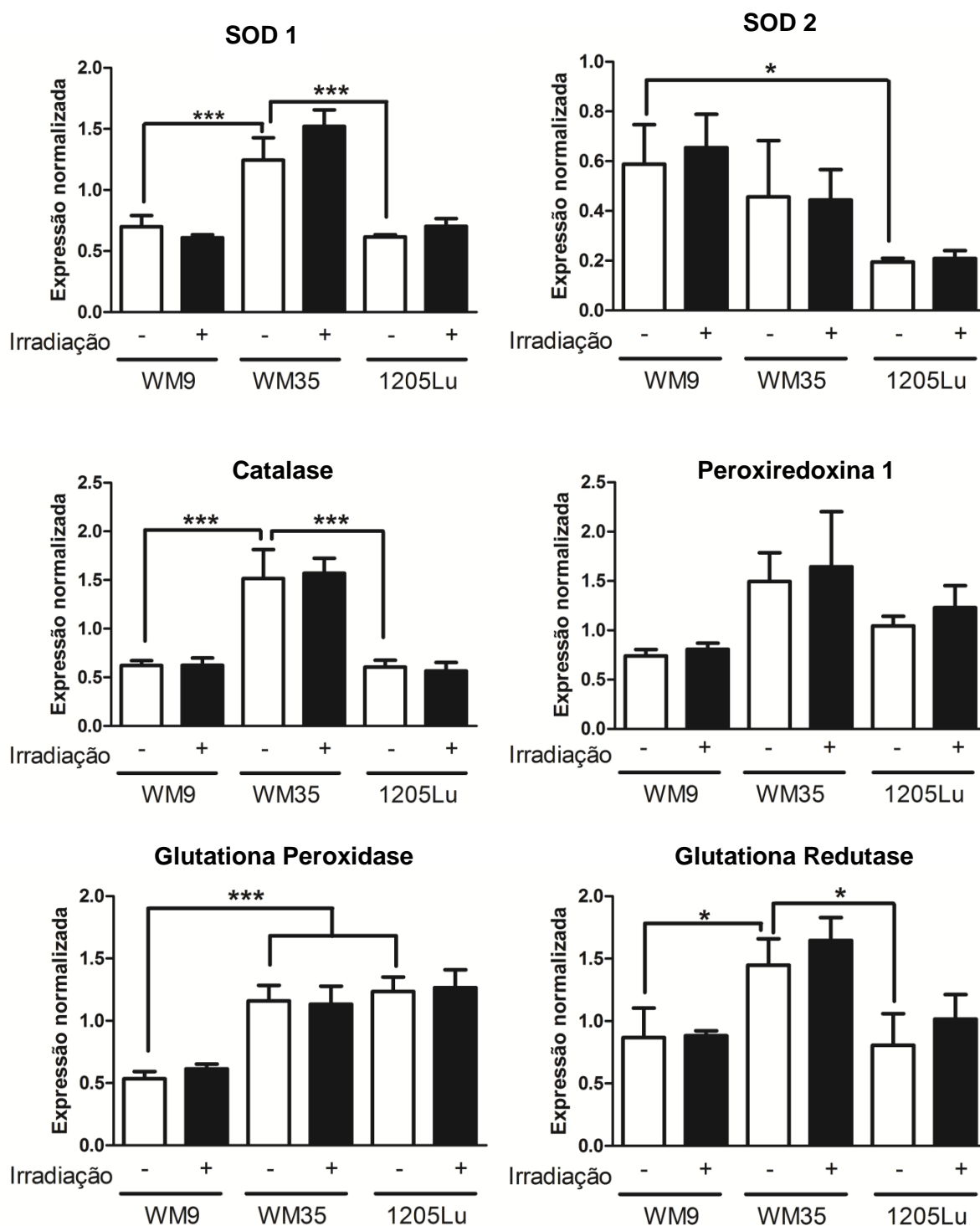


FIGURA 47: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A expressão gênica das enzimas antioxidantes (SOD 1, SOD 2, catalase, peroxiredoxina 1, glutathione peroxidase e glutathione redutase), normalizada pela expressão dos genes *hHMBS* e *hHPRT*, foi analisada 18 h após o tratamento (barras pretas) ou não (barras brancas) com RBAC e irradiação, pelo método do RT-qPCR, conforme descrito no item 4.29. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ .



Embora não haja uma enzima que atue diretamente sobre o  $^1\text{O}_2$ , já foi demonstrado que, em alguns organismos unicelulares, a fotossensibilização levou a um aumento de expressão das enzimas SOD, catalase (Kim, Kim *et al.*, 2002) e de um homólogo da enzima glutathione peroxidase (Fischer, Eggen *et al.*, 2006) (Fischer, Krieger-Liszkay *et al.*, 2004). A superexpressão de homólogos das enzimas glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase tornou as algas da espécie *Chlamydomonas reinhardtii* mais resistentes contra a ação de agentes produtores de  $^1\text{O}_2$  (Fischer, Ledford *et al.*, 2012). Em mamíferos, há relatos de aumento de sensibilidade de células leucêmicas ao  $^1\text{O}_2$  quando as enzimas SOD ou catalase foram inibidas (Kim, Lee *et al.*, 2006). Já a superexpressão da enzima glutathione peroxidase possui efeito protetor contra o  $^1\text{O}_2$  em células de câncer de mama (Wang, Qian *et al.*, 2001).

Dessa forma, a expressão das enzimas antioxidantes 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  também foi analisada e, conforme pode ser observado na figura 47, a fotossensibilização das células de melanoma humano não levou à modulação da expressão de enzimas antioxidantes. Alguns estudos sugerem um papel modulador do  $^1\text{O}_2$  na expressão gênica de algumas enzimas antioxidantes em organismos eucariotos. Por exemplo, Panich e colaboradores (2012) observaram que a expressão da enzima glutathione-S-transferase é aumentada a partir de 8 h após a exposição de células de melanoma murino B16-F10 à radiação UVA (Panich, Onkoksoong *et al.*, 2012)(Panich, Onkoksoong *et al.*, 2012)(Panich, Onkoksoong *et al.*, 2012), uma fonte de  $^1\text{O}_2$  (Klotz, Holbrook *et al.*, 2001). Adicionalmente, Golab e colaboradores (2003) relataram um aumento de expressão da enzima Mn-SOD (SOD 2) em células de adenocarcinoma murino após fotossensibilização com fotofrina, de forma tempo-dependente.

Apesar de os resultados aqui apresentados não mostrarem modulação da expressão gênica das enzimas antioxidantes para nenhuma das linhagens, é importante investigar a atividade destas enzimas após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , uma vez que algumas enzimas, como a SOD e a catalase, podem perder atividade após o tratamento direto com o  $^1\text{O}_2$  (Escobar, Rubio *et al.*, 1996; Kim, Kwon *et al.*, 2001).

### 5.2.9 Avaliação dos danos ao DNA pelo ensaio cometa e habilidade de reparo do DNA

Os níveis de danos ao DNA basais de todas as linhagens foram avaliados pelo ensaio cometa. Neste ensaio, além de avaliar o nível de quebra do DNA, também se pode estimar a ocorrência de bases oxidadas que não geram quebras espontaneamente (ou que não são álcali-lábeis, uma vez que a corrida eletroforética por esta metodologia ocorre em pH maior que 13), pela utilização de enzimas de reparo. Neste estudo, foi utilizado o tratamento com a enzima hOGG1, que reconhece especificamente a 8-oxodGuo, mas não outros tipos de lesões. Assim, em amostras que inicialmente não apresentavam altos níveis de quebras, mas possuíam altos níveis de 8-oxodGuo, quando tratadas com a hOGG1, teriam essas lesões reveladas.

Conforme pode ser observado na figura 48, os níveis basais de danos ao DNA nas 3 linhagens foi equivalente. A princípio, era esperado que as células da linhagem WM35 apresentassem maiores níveis de danos, uma vez que foi observado que, no modelo plasmidial, a feomelanina pode levar à quebra do DNA (Figura 22). Além disso, incubando células de melanoma murino com eumelanina, em concentrações a partir de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  foi observada a ocorrência de quebra no DNA (Hill e Hill, 1987). Após 60 min de remoção da eumelanina, as células já iniciavam o processo de reparo do DNA lesionado, indicando que a presença de melanina pode levar ao dano oxidativo do DNA. Entretanto, no nosso estudo, não foram observadas diferenças do índice de danos ao DNA, após tratamento ou não com hOGG1. Deve-se levar em consideração que, nos ensaios utilizando plasmídeos, o DNA foi incubado com excesso de melaninas (em cerca de 30 x), para favorecer a visualização dos danos, uma vez que a corrida eletroforética tem uma sensibilidade limitada. Entretanto, para a linhagem WM35, os níveis de feomelanina eram bastante baixos. Do total de melanina sintetizado na célula, espera-se que apenas uma pequena porção da melanina produzida em uma célula tenha acesso ao núcleo. Desta forma, é possível que haja diferença nos níveis de danos, mas em níveis tão baixos que a técnica em questão não pode distingui-los. Adicionalmente, não se pode excluir a possibilidade de que haja diferença de habilidade de reparo entre as linhagens.

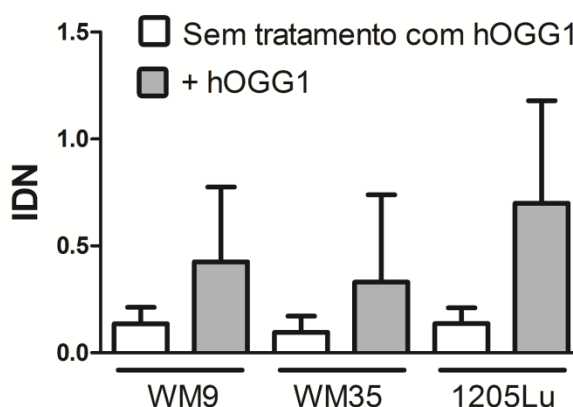


FIGURA 48: COMPARAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS BASAIS DE DANOS AO DNA ENTRE AS LINHAGENS WM9, WM35 E 1205Lu.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Os níveis basais de danos ao DNA foram analisados pelo ensaio cometa, conforme descrito em 4.32, estão expressos como IDN. Neste gráfico, estão mostrados os níveis basais de danos antes (barras brancas) e após o tratamento do DNA com a enzima de reparo hOGG1 (barras cinzas). O gráfico está representado como a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (análise por ANOVA, seguido de teste *pos-hoc* Tukey).

Os níveis de danos ao DNA causados pelo  $^1\text{O}_2$  foram avaliados imediatamente e 18 h após a irradiação. Como mostrado na figura 49, o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  não levou à quebra direta do DNA, mas levou à formação de 8-oxodGuo (grupos RBAC + irradiação + hOGG1), imediatamente após o término do tratamento com o  $^1\text{O}_2$  (aumento de 5,5 x do IDN da linhagem WM9; 5,6 x para a WM35 e 3,7 x para a 1205Lu). Este dado está de acordo com o que é descrito na literatura, uma vez que a principal lesão gerada pelo tratamento do DNA com  $^1\text{O}_2$  é a 8-oxodGuo (Ravanat, 2000; Ravanat, Saint-Pierre *et al.*, 2001; Ravanat, Sauvaigo *et al.*, 2004), sendo a quebra do DNA um evento secundário (Duarte, Gasparutto *et al.*, 2001; Theruvathu, Jaruga *et al.*, 2007). A exposição das células ao RBAC ou à irradiação, separadamente, não originou danos ao DNA (Figura 49).

Embora não tenha sido observado um papel da feomelanina na proteção do DNA contra a ação do  $^1\text{O}_2$ , como sugerido pelos ensaios em modelo plasmidial, outros autores, utilizando linhagens de melanoma altamente pigmentadas (em torno de 160  $\mu\text{g}$  de melanina total / mg de proteína) observaram proteção do DNA mitocondrial em relação às células de melanoma pouco pigmentadas, após tratamento com UVA (Swalwell, Latimer *et al.*, 2012). No nosso caso, é possível que

o efeito da feomelanina não seja tão pronunciado devido aos baixos níveis deste pigmento.

Dezoito horas após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , observa-se que houve reparo praticamente total das lesões na linhagem 1205Lu, uma vez que não se observa diferença estatisticamente significativa entre os IDN dos grupos RBAC + irradiação e RBAC + irradiação + hOGG1 (Figura 49 C). Nas linhagens WM9 e WM35 (Figuras 49 A e B), parte das bases oxidadas remaneceram. Novamente, não foi observada relação entre a presença de feomelanina e a capacidade de reparo do DNA oxidado pelo  $^1\text{O}_2$ . Entretanto, é interessante observar que a linhagem 1205Lu foi a que mostrou menor perda de viabilidade 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$  (Figuras 41 C e D), ou seja, esta linhagem foi a mais resistente contra a ação do  $^1\text{O}_2$ , que poderia estar relacionada à maior capacidade de reparo de DNA que esta linhagem demonstrou possuir (Figura 48).

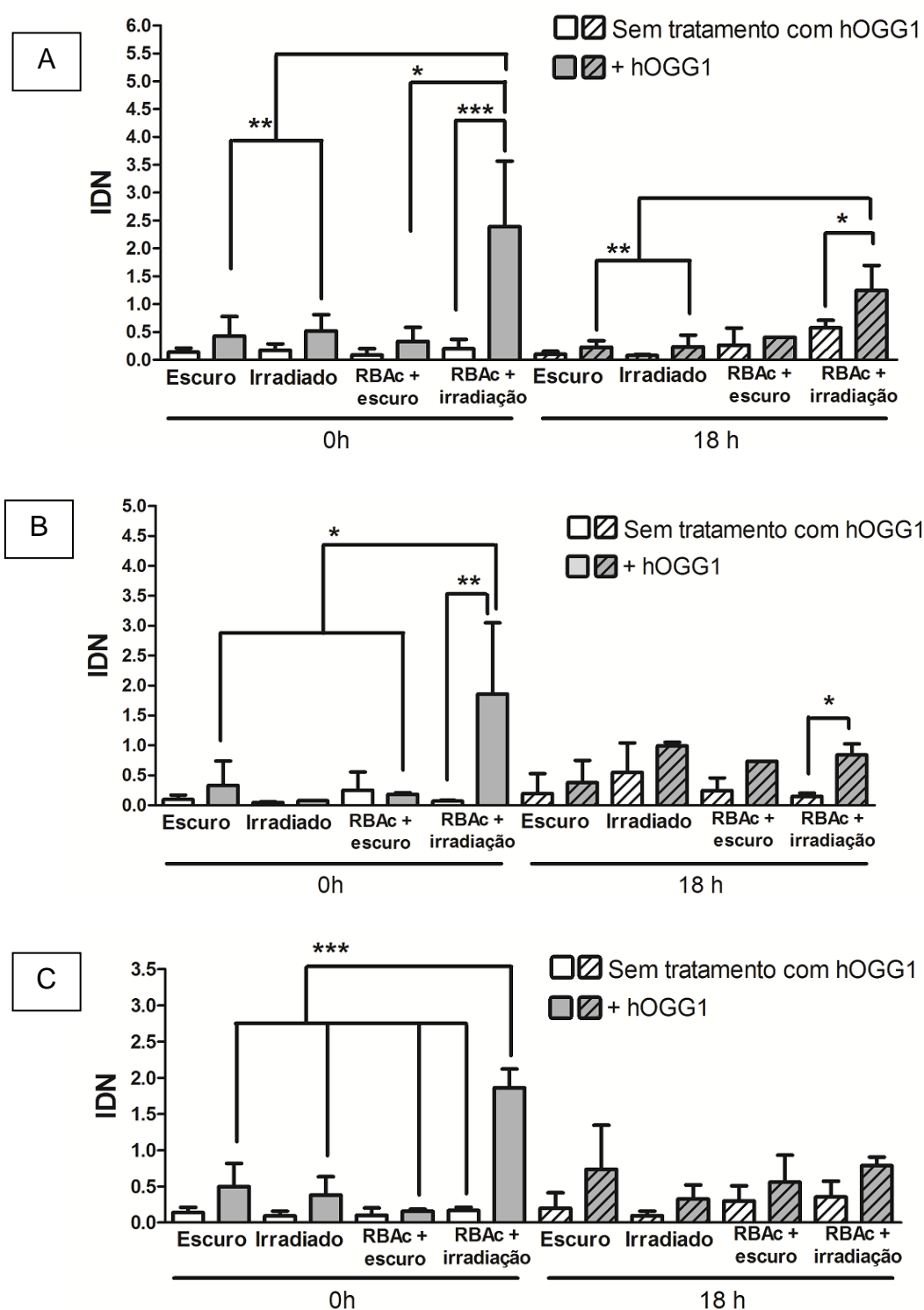


FIGURA 49: NÍVEIS DE DANOS AO DNA NAS 3 LINHAGENS, 0 E 18 h APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ , AVALIADOS PELO ENSAIO COMETA.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células foram tratadas na presença e ausência de RBAc e irradiação. Imediatamente (barras lisas) ou 18 h após este tratamento (barras listradas), os níveis de danos ao DNA foram analisados pelo Ensaio Cometa. Para avaliação da presença de 8-oxodGuo, foi utilizado o tratamento com a enzima hOGG1 (barras cinzas). A) linhagem WM9; B) linhagem WM35 e C) linhagem 1205Lu. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em duplicata. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A expressão da enzima de reparo de DNA hOGG1 também foi analisada por qPCR. Não foi observada nenhuma diferença de expressão basal da hOGG1 entre as 3 linhagens, embora a linhagem WM35, aparentemente, expresse um pouco mais hOGG1 do que as demais linhagens (Figura 50). Embora se acreditasse que a *hOGG1* fosse um *housekeeping gene* (ou seja, que sua expressão fosse constitutiva e não modulável) (Dhenaut, Boiteux *et al.*, 2000), estudos demonstraram que hOGG1 pode ter sua expressão modulada por p53 (Chatterjee, Mambo *et al.*, 2006) e pelo BRCA1, que também controla a expressão de outras proteínas envolvidas no reparo via BER (Saha, Rih *et al.*, 2010). Um estudo demonstrou que, quando células de carcinoma colorretal foram tratadas com um agente alquilante de DNA, houve um aumento da expressão de hOGG1 (Lee, Kim *et al.*, 2004). Estudos anteriores utilizando técnicas de microarranjo observaram que células tumorais com maior grau de invasividade teriam níveis aumentados de enzimas envolvidas no reparo via BER, inclusive a hOGG1 (Kauffmann, Rosselli *et al.*, 2008). Os resultados aqui apresentados mostram um perfil inverso: as células metastáticas, WM9 e 1205Lu, apresentaram níveis de expressão levemente menores de hOGG1 com relação à linhagem WM35, uma linhagem originalmente de crescimento radial. Este pequeno aumento poderia estar relacionado à maior produção de EROS provenientes da melanogênese, que é mais pronunciada nesta linhagem e que poderia manter um nível basal de danos ao DNA maior. De fato, estudos mostram que, em condições de estresse oxidativo crônico, há aumento da expressão de hOGG1. Em um estudo utilizando pacientes com Parkinson, foi mostrada uma maior abundância de OGG1 mitocondrial na substância negra cerebral (Fukae, Takanashi *et al.*, 2004), que foi relacionada ao estresse oxidativo presente nestas células, possivelmente decorrente da disfunção da cadeia respiratória (Keeney, Xie *et al.*, 2006). Variações na expressão das isoformas de hOGG1 foram relacionados ao desenvolvimento da doença de Alzheimer (Dorszewska, Kempisty *et al.*, 2009), enquanto maiores níveis de hOGG1 foram encontrados em indivíduos cronicamente expostos ao arsênio (Mo, Xia *et al.*, 2006); condições onde a produção de EROS é conhecidamente aumentada (Flora, 1999; Perry, Cash *et al.*, 2002). Adicionalmente, foi mostrado que, quando indivíduos controle eram comparados com pacientes portadores doença pulmonar obstrutiva crônica, estes últimos possuíam maiores níveis de hOGG1 (Deslee, Adair-Kirk *et al.*, 2010). Tendo em vista estes resultados, é possível que a

modulação de hOGG1 ocorra em condições de produção de EROS crônica, mas não em resposta à formação de EROS pontual, como foi o caso do tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , uma vez que o tratamento com RBAC + irradiação não foi capaz de induzir a expressão da enzima hOGG1 (Figura 50), embora tenha gerado 8-oxodGuo em nível nuclear (Figura 49). Similarmente, quando fibroblastos humanos foram fotossensibilizados, não foi observado aumento da capacidade de reparo de DNA destas células 18 h após o tratamento (Bercht, Flohr-Beckhaus *et al.*, 2007).

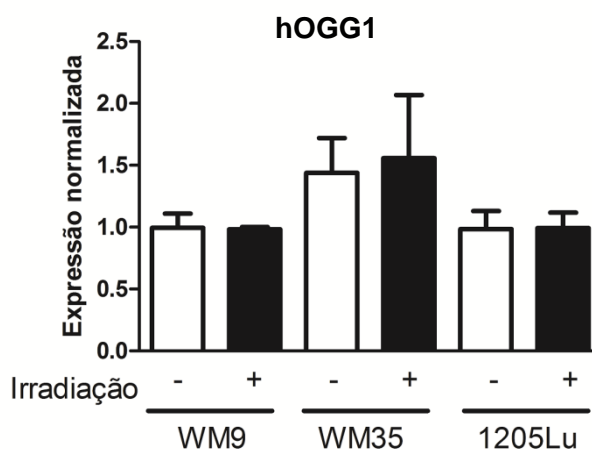


FIGURA 50: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA hOGG1 APÓS O TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células foram tratadas com o RBAC e expostas (barras pretas) ou não (barras brancas) à irradiação. Após 18 h, os níveis de mRNA de hOGG1 foram analisados por RT-qPCR e os dados foram normalizados pelos genes *hHMBS* e *hHPRT*. O gráfico representa a média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes.

#### 5.2.10 Avaliação do ciclo celular

Levando-se em consideração a perda de viabilidade apresentada pelas células nos experimentos descritos em 5.2.5 (pg. 127) e a ocorrência de danos ao DNA, foi investigado se haveria modificação no ciclo celular após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Este experimento se baseia nas alterações do conteúdo de DNA que as células sofrem no decorrer do ciclo, que pode ser determinado pela utilização de um intercalante de DNA (neste caso, o iodeto de propídeo). Através desta análise, é revelada a distribuição das células dentre as fases do ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$  e M) e também se pode detectar as células não viáveis, por estas possuírem DNA fragmentado (fase Sub- $G_1$ ).

Neste experimento, foram utilizadas apenas as células após 18 h do tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , uma vez que, para serem visualizadas alterações no ciclo celular, é necessário aguardar, ao menos, um tempo de dobramento (foram realizados testes preliminares e observou-se que o tempo de dobramento era inferior a 24 h). O perfil dos histogramas obtidos para as 3 linhagens estão demonstrados abaixo (Figura 51), onde se pode observar que a separação das células em cada fase do ciclo está bem definida:

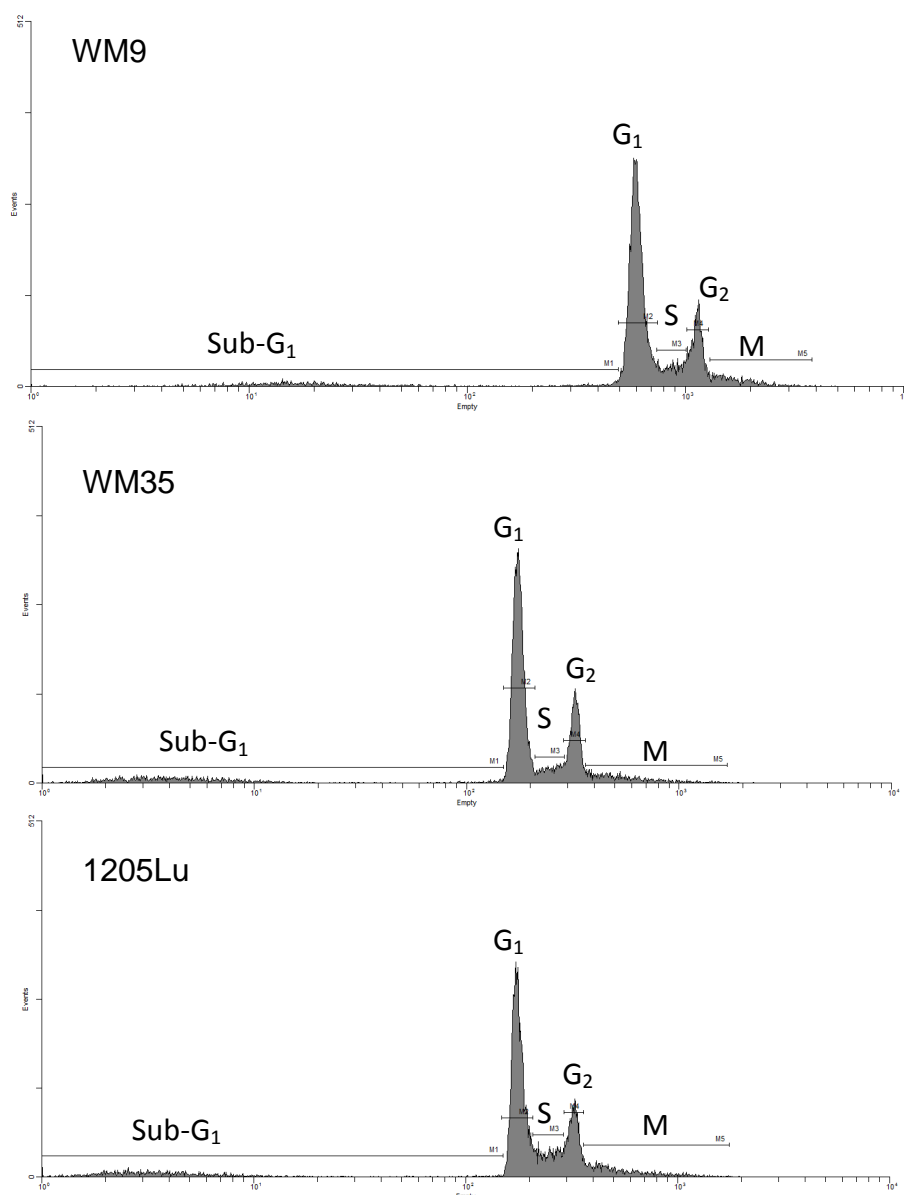


FIGURA 51: HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DOS DADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DO CICLO CELULAR.

FONTE: o autor (2012).

NOTA: Histogramas obtidos para análise do ciclo celular para as 3 linhagens utilizadas neste trabalho. Foi possível analisar separadamente as fases Sub-G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M.



Conforme pode ser observado na figura 52, não foram observadas quaisquer alterações na quantidade de células presentes em cada fase do ciclo celular nas linhagens WM9 e 1205Lu, exceto pelo pequeno aumento de células em Sub-G<sub>1</sub> no grupo RBAC + irradiação na linhagem 1205Lu (7 % de células em Sub-G<sub>1</sub> no grupo controle *versus* 12 % de células em Sub-G<sub>1</sub> no grupo RBAC + irradiação, ou seja, aumento de 70 %). Isso indica que, nestas condições, há um aumento da proporção de células 1205Lu com DNA fragmentado, fornecendo um primeiro indício da entrada destas células em apoptose. A ausência de aumento significativo do número de células em Sub-G<sub>1</sub> está de acordo com a dose de RBAC escolhida para este experimento, uma vez que mais de 80 % de viabilidade é mantida 18 h após o tratamento com 2 µg.mL<sup>-1</sup> de RBAC (Figuras 41 C e D).

As células da linhagem WM35 foram mais sensíveis ao tratamento com RBAC + irradiação, sendo que foi observado um aumento da quantidade de células na fase G<sub>1</sub> (45 % de células em G<sub>1</sub> no grupo controle *versus* 51 % de células em G<sub>1</sub> no grupo RBAC + irradiação, ou seja, aumento de 14 %) com concomitante diminuição da quantidade de células na fase de síntese (12 % de células em S no grupo controle *versus* 7 % de células em G<sub>1</sub> no grupo RBAC + irradiação, ou seja, diminuição de 42 %) (Figura 52). Desta forma, a redução da viabilidade celular observada para a linhagem WM35 pelos métodos do MTT e cristal violeta, 18 h após o tratamento com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Figuras 41 C e D) pode estar refletindo tanto a morte celular propriamente dita, quanto à parada de proliferação, pois, em ambos os casos, o resultado é um menor número de células.

O tratamento apenas com RBAC ou apenas com irradiação mostrou não alterar o ciclo celular de nenhuma das linhagens aqui estudadas (Figura 52).

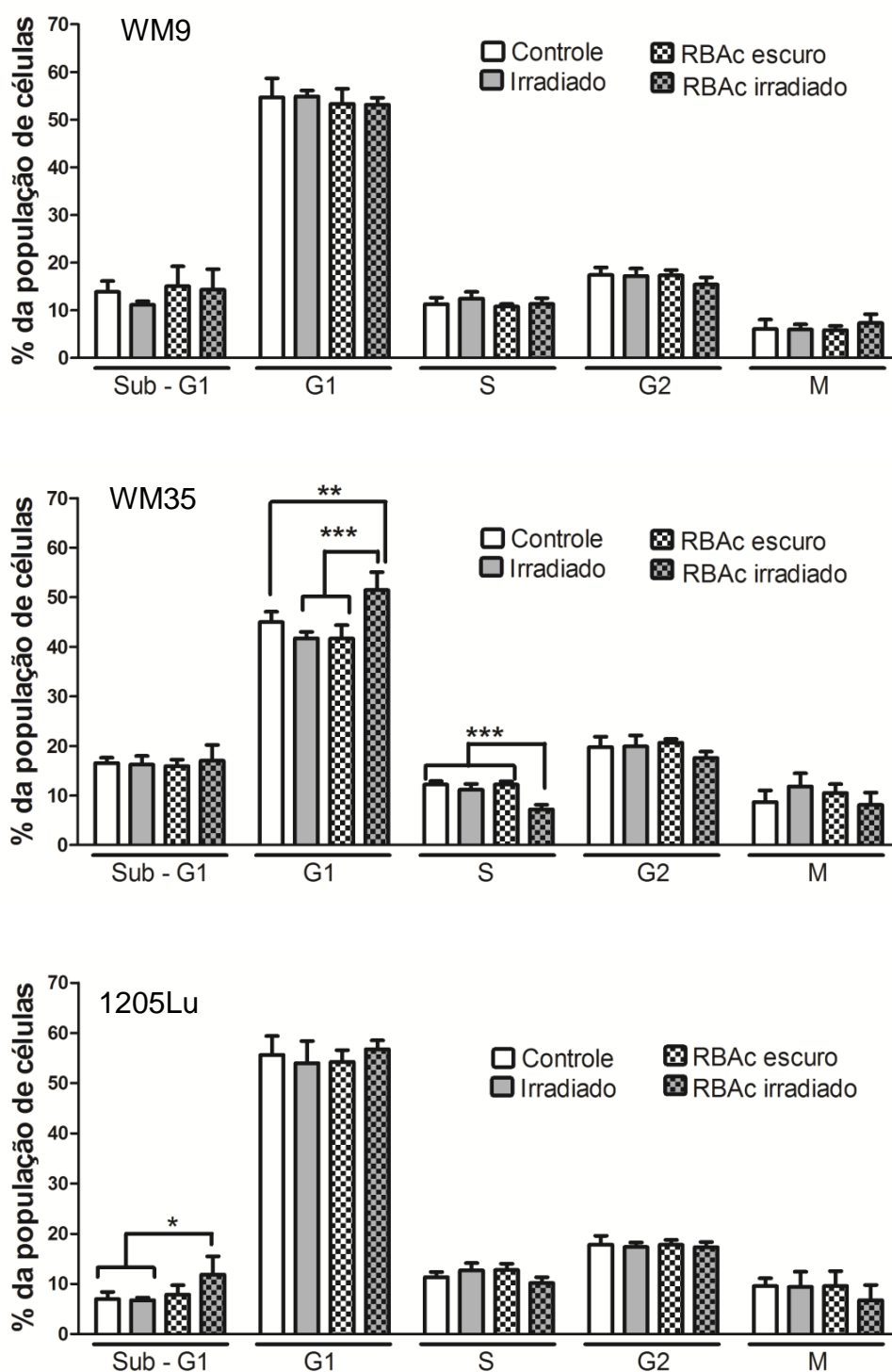


FIGURA 52: ANÁLISE DO CICLO CELULAR EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO APÓS 18 h DA EXPOSIÇÃO AO  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: As células de melanoma humano foram incubadas com o RBAc por 2 h e, posteriormente, irradiadas, para produção de  $^1\text{O}_2$ . Dezoito horas após a irradiação, as células foram coletadas, marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo, para avaliação da distribuição da população de células entre as fases do ciclo celular. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A ação da PDT sobre o ciclo celular depende, aparentemente, do tipo de célula e do protocolo de fotossensibilização utilizados. Enquanto o tratamento de células HaCaT (queratinócitos humanos imortalizados) com protoporfirina IX + irradiação na faixa de 634 nm levou a um estímulo da divisão celular, sendo observado um aumento de células na fase S do ciclo celular (Blazquez-Castro, Carrasco *et al.*, 2012), a utilização da PDT em células malignas possui um efeito citotóxico, geralmente relacionado à indução de apoptose.

Alguns estudos demonstraram que a ação do  $^1\text{O}_2$  sobre células neoplásicas malignas levam à parada do ciclo. Por exemplo, Chen e colaboradores (2011) mostraram que o tratamento de células cancerígenas de esôfago com ácido 5-aminolevulínico e irradiação causou parada das células em  $G_0/G_1$ , o que pode ter levado as células a entrar em apoptose, com concomitante aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão de Bcl-2.

Em outro estudo, os autores expuseram células de carcinoma epidermóide humanas à PDT (fotossensibilizador: ftalocianina Pc4) e observaram que, após 12 h, houve um aumento de 50 % da quantidade de células na fase  $G_0/G_1$ . Essa parada no ciclo foi relacionada ao aumento de expressão de WAF1/CIP1/p21, inibidores de ciclina quinases que atuam no *checkpoint* durante a transição entre a fase  $G_1$  e S. Como consequência, observou-se que houve diminuição da expressão e atividade das ciclinas D1 e E e das cdk's 2 e 6. Os autores sugeriram que a ativação da WAF1/CIP1/p21 e consequente inibição das ciclinas e cdk's teria sido irreversível, comprometendo as células a entrar em apoptose (Ahmad, Feyes *et al.*, 1998).

Por outro lado, utilizando um fotossensibilizador da classe das ftalocianinas, Shao e colaboradores (2012) mostraram que as células de hepatoma humano HepG2 sofrem parada na fase  $G_2/M$  do ciclo celular, com concomitante diminuição de células em  $G_1/S$ . Neste estudo, foi demonstrada a ativação da caspase 3 que, por sua vez, teria mediado a ocorrência de apoptose e necrose 24 h após a irradiação. Finalmente, há também estudos que não observam modulação do ciclo celular após a PDT, como, por exemplo, o trabalho de Almann e colaboradores (2000), onde células de carcinoma escamoso humano foram tratadas pela PDT, utilizando o ácido 5-aminolevulínico como fotossensibilizador.

Sabe-se que a progressão das células em G<sub>1</sub> é dependente da ação de cdk's e da expressão das ciclinas D e E (Sherr, 2000). Em particular, os níveis de expressão da ciclina D1, uma estimuladora da mitose, é bastante variável entre os melanomas (De Andrade, Leon *et al.*, 2012). Além disso, a ciclina D1 pode ser regulada negativamente pela ação do supressor de tumor PTEN, frequentemente mutado em cânceres (Salmena, Carracedo *et al.*, 2008). Interessantemente, as células WM35 são PTEN positivas, enquanto as células das linhagens WM9 e 1205Lu não possuem PTEN (Paraiso, Xiang *et al.*, 2011). No resultados apresentados, observa-se que as células da linhagem WM35 pararam em G<sub>1</sub> após o tratamento com RBAC + irradiação, enquanto as demais linhagens, não. A expressão diferencial de PTEN e consequente modulação da ciclina D1 podem estar relacionadas com as diferentes respostas observadas neste trabalho. Já foi demonstrado que a expressão da ciclina D1 é diminuída em células de carcinoma epidermóide após o tratamento com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Ahmad, Feyes *et al.*, 1998).

Além de supressores de tumor, como o PTEN, outras proteínas estão relacionadas à modulação do ciclo celular. Neste estudo, também foi avaliado se há modulação dos inibidores do ciclo celular: p16, p14/ARF, p21 e p53 pelo <sup>1</sup>O<sub>2</sub>.

Inicialmente, foi observado que as linhagens possuem níveis semelhantes de p21 e p53, mas diferem quanto ao nível de expressão de p14/ARF e p16, sendo que a linhagem WM9 é a única que expressa p16 e a que menos expressa p14/ARF (Figura 53). A ausência de p16 na linhagem WM35 está de acordo com o descrito na literatura (Florenes, Bhattacharya *et al.*, 1996).

Como esperado para as linhagens WM9 e 1205Lu, não houve qualquer modulação das proteínas em questão (Figura 53), concordando com a ausência de alteração da progressão das células entre as fases do ciclo celular (Figura 52), embora seja sabido que o dano no DNA pode levar ao aumento de expressão de p53/p21 (Fukuchi, Tomoyasu *et al.*, 1998; He, Siddik *et al.*, 2005).

A parada em G<sub>1</sub> das células da linhagem WM35 (Figura 52) não foi acompanhada por aumento de expressão dos inibidores do ciclo celular (Figura 53). Sabe-se que uma das principais vias que são ativadas pelo dano ao DNA é o da proteína p53 (Kastan, Onyekwere *et al.*, 1991) e que, em melanomas, p53

frequentemente não é mutado (Houben, Hesbacher *et al.*, 2011). Em particular, em células da linhagem WM35, o p53 é selvagem (Khlgatian, Hadshiew *et al.*, 2002). A atividade de p53 também pode ser modulada por fosforilação, processo que evita que p53 seja inibida por outros fatores (Shieh, Ikeda *et al.*, 1997) ou por p14/ARF (Gjerset, 2006). A regulação pós-traducional de p21 também é conhecida e pode ocorrer independentemente de p53 (Zeng e El-Deiry, 1996). Desta forma, é possível que estes fatores tenham sido ativados pelo dano ao DNA causado pelo  $^1\text{O}_2$  e que tenham tido um papel importante para que ocorresse a parada do ciclo em  $G_1$ , mesmo sem indução de sua expressão gênica. Para solucionar esta questão, poderia ser interessante a utilização da técnica de *immunoblotting*, utilizando anticorpos específicos contra as isoformas fosforiladas.

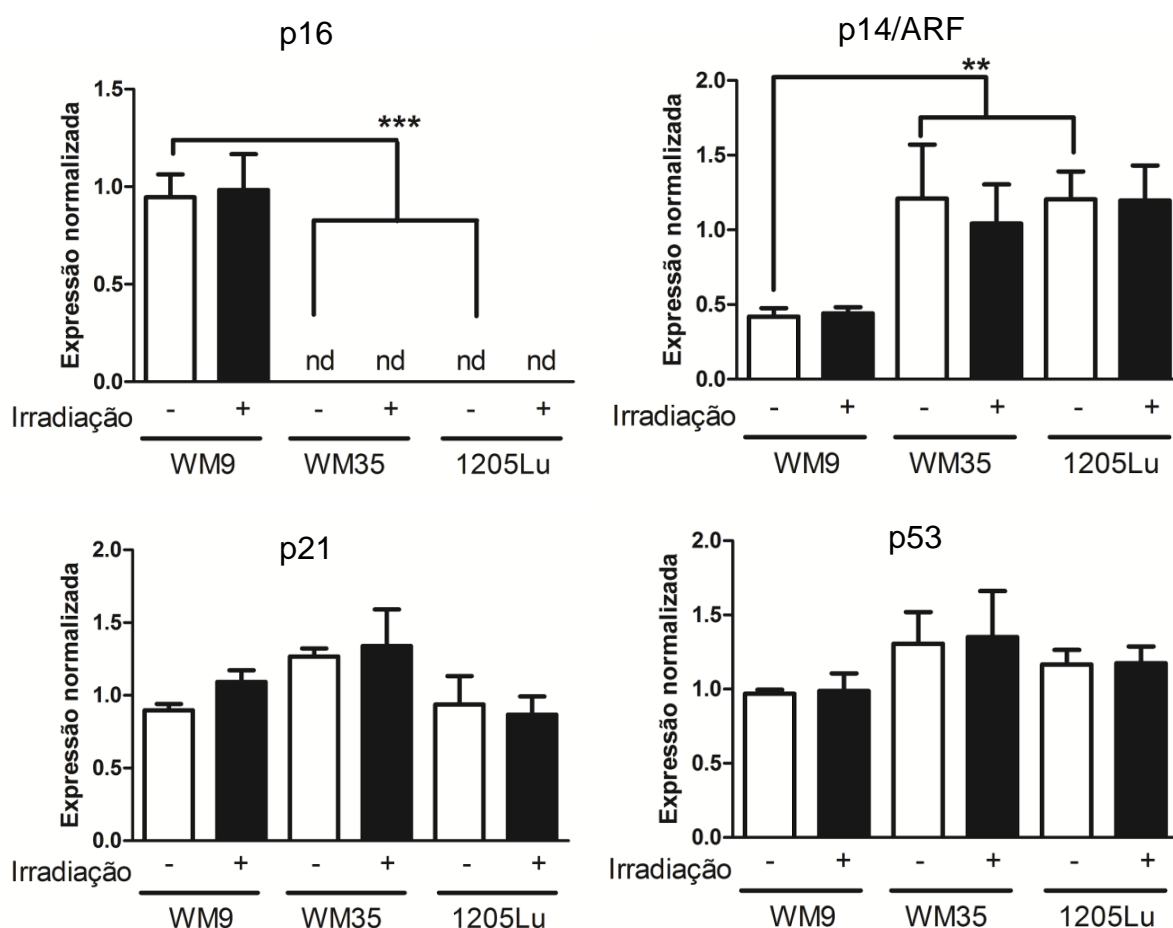


FIGURA 53: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO CICLO CELULAR, APÓS 18 h DO TRATAMENTO COM  $^1\text{O}_2$ .

FONTE: o autor (2012).

NOTA: A expressão gênica das proteínas p16, p14/ARF, p21 e p53, normalizada pela expressão de *hHMBS* e *hHPRT*, foi analisada 18 h após o tratamento (barras pretas) ou não (barras brancas) com RBAC e irradiação, pelo método do RT-qPCR, conforme descrito no item 4.29. Os gráficos representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6. DISCUSSÃO FINAL

O papel das melaninas, e em particular, da feomelanina, sobre o desenvolvimento do melanoma vem sendo alvo de discussão, devido à maior incidência desta neoplasia em indivíduos de fenótipo caucasiano (Gandini, Sera, Cattaruzza, Pasquini, Zanetti *et al.*, 2005; Berwick, Erdei *et al.*, 2009). O papel da feomelanina como fotossensibilizador já foi demonstrado por outros autores (Chedekel, Smith *et al.*, 1978), enquanto outros papéis da feomelanina no contexto celular foram pouco explorados.

Durante a evolução dos melanócitos até o melanoma, ocorre a perda da estrutura dos melanossomos, organelas onde ocorre a síntese da melanina (Rhodes, Seki *et al.*, 1988; Borovansky, Mirejovsky *et al.*, 1991). Neste contexto, há extravasamento de melaninas e de seus precursores (Jimbow, Lee *et al.*, 1993), o que os disponibiliza para interagir com diferentes estruturas celulares, inclusive o DNA. Nosso estudo sobre a interação direta entre as melaninas e o DNA mostrou que estes pigmentos podem levar ao dano da estrutura do DNA plasmidial, gerando, além de quebras, o dano oxidativo. Este mecanismo é dependente da presença de metais como o ferro e o cobre; interação que é favorecida pela presença de grupamentos carboxila das melaninas (Potts e Au, 1976) e pela capacidade das melaninas de liberar íons ferro da ferritina. A ação das melaninas sobre o DNA, aparentemente, depende de sua proximidade do mesmo; situação que, como demonstramos neste trabalho, é favorecida pela até então desconhecida capacidade de ligação das melaninas nos sulcos menores do DNA. Esta propriedade resulta, além do dano ao DNA, em menor acesso de enzimas de reparo do DNA às lesões. Entretanto, quando avaliamos os níveis basais de danos ao DNA em células das linhagens de melanoma humano WM35, produtoras de feomelanina e WM9 e 1205Lu, não produtoras de feomelanina, não se evidenciaram diferenças significativas entre as linhagens, analisadas pelo ensaio cometa. A divergência entre os resultados obtidos em modelo plasmidial e em células pode ser devido aos baixos níveis de feomelanina na linhagem WM35, à pequena, embora não significativa, maior expressão constitutiva de hOGG1 por estas células ou então, à sensibilidade do método utilizado. Para este último caso, uma opção seria a medida dos danos do

DNA por métodos mais sensíveis, como por HPLC/MS, conforme descrito por outros autores (Frelon, Douki *et al.*, 2000). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de aumento de danos ao DNA pelas melaninas em condições onde a melanogênese é estimulada, uma vez que já foi demonstrado que, nesse caso, há parada do ciclo celular, com concomitante aumento de expressão de p21, uma proteína responsiva ao aumento de danos ao DNA (Cunha, Kawahara *et al.*, 2012).

Além da ação fotossensibilizadora da feomelanina, é documentada a geração de EROS durante a sua síntese (Munoz-Munoz, García-Molina *et al.*, 2009; Cunha, Kawahara *et al.*, 2012), além de seu efeito “auto-oxidativo” (Heikkila e Cohen, 1973; Korytowski, Hintz *et al.*, 1985). No estudo das melaninas sobre o DNA, observamos que ela é capaz de produzir EROS mesmo na ausência da luz. Levando este fato em consideração, foi formulada a hipótese de que a linhagem WM35 possuía uma produção basal de EROS maior que as demais linhagens. Embora não tenha sido possível acessar os níveis de EROS de cada linhagem, a linhagem WM35 demonstrou possuir maior conteúdo de glutathione total, além de expressar mais  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase, SOD 1, catalase, e glutathione reductase, em relação às outras linhagens. Este perfil pode indicar que estas células possuem um nível maior de produção de EROS, uma vez que suas barreiras contra estas espécies estão elevadas.

Enquanto várias propriedades deletérias vêm sendo relacionadas às melaninas, por outro lado, já foi descrito que este pigmento é um potente *scavenger* de radicais (Rozanowska, Sarna *et al.*, 1999), inclusive de  $^1\text{O}_2$  (Tada, Kohno *et al.*, 2010). O  $^1\text{O}_2$  tem significativa importância na biologia do melanoma, pois, além ser formado pela exposição à radiação UVA, um dos fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma (Moan, Dahlback *et al.*, 1999; Coelho e Hearing, 2010), é considerado como um possível aliado para o tratamento do mesmo, através da utilização da PDT (Davids e Kleemann, 2010). Entretanto, neste caso, as melaninas aparecem como um obstáculo ao sucesso da PDT, pois podem possuir um papel fotoprotetor (Wang, Marino *et al.*, 2008), além da já comentada capacidade *scavenger* de  $^1\text{O}_2$ . Em um modelo plasmidial, utilizando fontes de  $^1\text{O}_2$  dependentes e independentes de luz, mostramos que o  $^1\text{O}_2$  pode reagir com as melaninas, o que resulta em uma menor habilidade de quebrar o DNA. Desta forma, além de diminuir

a eficácia da PDT por absorver luz, as melaninas poderiam proteger importantes alvos da PDT contra os danos. Esta mesma relação foi investigada em células, pela utilização do fotossensibilizador RBAC. Assim como descrito por outros autores (Ravanat, 2000), demonstramos que o  $^1\text{O}_2$  levou majoritariamente à formação de 8-oxodGuo, em relação à quebras de fitas de DNA. Entretanto, não foi encontrada diferença com relação aos níveis de danos ao DNA entre as linhagens produtoras ou não de feomelanina, após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Dezoito horas após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , grande parte dos danos já havia sido reparado, alcançando níveis próximos aos basais na linhagem 1205Lu. Embora os níveis de hOGG1 não tenham sido alterados, alguns estudos já demonstraram modulação positiva da hOGG1 frente à agentes oxidativos crônicos (Fukae, Takanashi *et al.*, 2004; Keeney, Xie *et al.*, 2006; Dorszewska, Kempisty *et al.*, 2009); neste caso, o tratamento foi pontual e não foi observada modulação da expressão desta enzima.

O tratamento com o  $^1\text{O}_2$  foi capaz de levar à parada do ciclo celular em G<sub>1</sub> nas células da linhagem WM35, que pode estar relacionado aos danos ao DNA causados por esta espécie, embora não tenha sido observada modulação gênica de p14/ARF, p16, p21 ou p53. Para as demais linhagens, não houve alterações na distribuição de células entre as fases do ciclo. O papel do  $^1\text{O}_2$  sobre o ciclo celular ainda é questão de debate e, aparentemente, varia com o tipo celular e a fonte de  $^1\text{O}_2$  utilizada (Chen, Zhao *et al.*, 2011; Blazquez-Castro, Carrasco *et al.*, 2012). Neste caso, em específico, existe ainda a diferença entre os estágios do melanoma de cada linhagem, sendo que a WM35 é de crescimento radial, enquanto as demais são metastáticas.

Um fato importante é que o  $^1\text{O}_2$  foi capaz de levar à morte celular em todas as linhagens, que pôde ser observada 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ . Este resultado indica que a PDT poderia ser considerada como alternativa para o tratamento de melanomas amelanóticos ou com baixa produção de melanina. A principal resposta frente ao  $^1\text{O}_2$  encontrada neste trabalho é o aumento da síntese de glutathione 18 h após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , que aconteceu independentemente do grau de agressividade ou conteúdo de melanina celular. O papel dos tióis na detoxificação de produtos gerados pelo  $^1\text{O}_2$  já havia sido relatado (Morgan, Dean *et al.*, 2004; Otsu, Sato *et al.*, 2005), mas, até o momento, apenas um estudo havia



mostrado um aumento dos níveis celulares de glutathione tardiamente à ação do  $^1\text{O}_2$  sem, no entanto, investigar possíveis mecanismos que justificassem esse efeito. Nós mostramos que o aumento dos níveis de glutathione não foi acompanhado pela indução da expressão das enzimas relacionadas ao metabolismo da glutathione, tampouco de outras enzimas antioxidantes, o que não descarta a possibilidade de uma modulação em nível pós-traducional. Esta questão permanece em aberto e pode ser alvo de futuras investigações sobre a resposta celular frente ao  $^1\text{O}_2$ .

## 7. CONCLUSÕES

Sobre o papel das melaninas e do  $^1\text{O}_2$  sobre o DNA plasmidial, conclui-se que:

- A feomelanina e, em maior extensão, a eumelanina, são capazes de levar à quebra do DNA, bem como gerar lesões oxidativas como a 8-oxodGuo e o TdhGly. O radical hidroxila é o principal envolvido neste mecanismo;
- Ambos os tipos de melanina são capazes de levar à liberação de ferro da ferritina;
- A oxidação das melaninas pelo  $^1\text{O}_2$  resulta em diminuição de seu potencial de induzir quebras de DNA;
- As melaninas se ligam aos sulcos menores do DNA, o que pode favorecer a ocorrência das quebras e impedir o acesso das enzimas de reparo de DNA às bases lesionadas.

No estudo de células de melanoma, produtoras ou não de feomelanina, e de sua resposta ao  $^1\text{O}_2$ , pode-se concluir que:

- Não há perda imediata de viabilidade celular quando células produtoras (WM35) ou não (WM9 e 1205Lu) de feomelanina são tratadas com  $^1\text{O}_2$  (até a dose de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do fotossensibilizador Rosa Bengala Acetilado e irradiação por 15 min). Após 18 h, observa-se significativa morte celular para todas as linhagens, não sendo observada diferença decorrente da presença de feomelanina;
- As células da linhagem WM35 apresentaram os maiores níveis de glutathione (30 % maior que na linhagem WM9 e 50 % maior do que na linhagem 1205Lu) e de expressão das enzimas  $\gamma$ -glutamylcisteína ligase (2 x mais do que a WM9 e 3,5 x mais do que a 1205Lu), SOD 1 (2 x mais do que as demais linhagens), catalase (2,5 x mais do que as demais linhagens) e glutathione redutase (1,6 x mais do que as demais linhagens), o que pode estar relacionado à maior síntese de feomelanina;

- Não houve alteração dos níveis de glutathione total imediatamente após o tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , para nenhuma das linhagens testadas. Entretanto, houve um aumento significativo dos níveis de glutathione após 18 h, sendo maior na linhagem 1205Lu (45 % de aumento), intermediária na linhagem WM9 (38 % de aumento) e mais branda na linhagem WM35 (18 % de aumento). Os níveis aumentados de glutathione não foram acompanhados por aumento de expressão das enzimas  $\gamma$ -glutamylcysteine ligase, glutathione peroxidase ou glutathione reductase;
- Não houve modulação da expressão gênica das enzimas antioxidantes catalase, SOD 1, SOD 2 ou peroxirredoxina 1 após o tratamento com  $^1\text{O}_2$ , para nenhuma das linhagens;
- Os níveis basais de danos oxidativos no DNA das 3 linhagens mostraram-se equivalentes;
- O tratamento com o  $^1\text{O}_2$  não levou à quebra imediata do DNA, mas levou a um aumento dos níveis de 8-oxodGuo de forma semelhante em todas as linhagens. Esses danos foram quase que totalmente reparados após 18 h, o que não foi acompanhado pelo aumento da expressão da enzima de reparo hOGG1;
- Não houve alteração da distribuição de células das linhagens WM9 e 1205Lu pelas fases do ciclo celular após 18 h do tratamento com o  $^1\text{O}_2$ , exceto pelo pequeno aumento do número de células em Sub-G<sub>1</sub>, para a linhagem 1205Lu. Por outro lado, observou-se um acúmulo de células da linhagem WM35 em G<sub>1</sub> (aumento de 14 %), acompanhado de diminuição de células em S (diminuição de 42 %), sem, no entanto, haver diferença na expressão de p14/ARF, p16, p21 ou p53;
- A ausência de resposta adaptativa ao  $^1\text{O}_2$ , bem como a não observação de diferenças significativas entre as linhagens produtoras ou não de feomelanina podem estar relacionadas à baixa produção de  $^1\text{O}_2$  pelo sistema empregado bem como ao baixo conteúdo de feomelanina nas células analisadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MALEK, Z. A. *et al.* The melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes--a shift in paradigm. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 2, p. 501-8, 2008.
- AHMAD, N. *et al.* Photodynamic therapy results in induction of WAF1/CIP1/P21 leading to cell cycle arrest and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 12, p. 6977-82, 1998.
- ALLMAN, R., COWBURN, P., MASON, M. Effect of photodynamic therapy in combination with ionizing radiation on human squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. **Br J Cancer**, v. 83, n. 5, p. 655-61, 2000.
- ALTIERI, F. *et al.* DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. **Antioxid Redox Signal**, v. 10, n. 5, p. 891-937, 2008.
- ANCANS, J. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Exp Cell Res**, v. 268, n. 1, p. 26-35, 2001.
- BABILAS, P. *et al.* Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, v. 26, n. 3, p. 118-32, 2010.
- BAIER, J. *et al.* Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 6, p. 1498-1506, 2007.
- BALDI, A. Ferritin contributes to melanoma progression by modulating cell growth and sensitivity to oxidative stress. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 9, p. 3175-3183, 2005.
- BALDI, A. *et al.* Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study. **Exp Dermatol**, v. 12, n. 2, p. 213-8, 2003.
- BASTIAENS, M. T. *et al.* Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. **Am J Hum Genet**, v. 68, n. 4, p. 884-94, 2001.
- BASU-MODAK, S., TYRRELL, R. M. Singlet oxygen: a primary effector in the ultraviolet A/near-visible light induction of the human heme oxygenase gene. **Cancer Res**, v. 53, n. 19, p. 4505-10, 1993.
- BEDRICK, A. E., RAMASWAMY, G., TCHERTKOFF, V. Histochemical determination of copper, zinc, and iron in some benign and malignant tissues. **Am J Clin Pathol**, v. 86, n. 5, p. 637-40, 1986.
- BENATHAN, M. Modulation of 5-S-cysteinyldopa formation by tyrosinase activity and intracellular thiols in human melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 6, n. 3, p. 183-9, 1996.

BENATHAN, M. Opposite regulation of tyrosinase and glutathione peroxidase by intracellular thiols in human melanoma cells. **Arch Dermatol Res**, v. 289, n. 6, p. 341-6, 1997.

BENATHAN, M., LABIDI, F. Cysteine-dependent 5-S-cysteinyl-dopa formation and its regulation by glutathione in normal epidermal melanocytes. **Arch Dermatol Res**, v. 288, n. 11, p. 697-702, 1996.

BERCHT, M. *et al.* Is the repair of oxidative DNA base modifications inducible by a preceding DNA damage induction? **DNA Repair (Amst)**, v. 6, n. 3, p. 367-73, 2007.

BERRA, C. M. *et al.* Plasmid DNA damage induced by singlet molecular oxygen released from the naphthalene endoperoxide DHPNO<sub>2</sub> and photoactivated methylene blue. **Química Nova**, v. 33, p. 279-283, 2010.

BERWICK, M., ERDEI, E., HAY, J. Melanoma epidemiology and public health. **Dermatol Clinics**, v. 27, n. 2, p. 205-214, 2009.

BITTINGER, F. *et al.* Production of superoxide by human malignant melanoma cells. **Melanoma Res**, v. 8, n. 5, p. 381-7, 1998.

BLAZQUEZ-CASTRO, A. *et al.* Protoporphyrin IX-dependent photodynamic production of endogenous ROS stimulates cell proliferation. **Eur J Cell Biol**, v. 91, n. 3, p. 216-23, 2012.

BOITEUX, S. *et al.* Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. **Biochem**, v. 31, n. 1, p. 106-10, 1992.

BOROVANSKY, J., MIREJOVSKY, P., RILEY, P. A. Possible relationship between abnormal melanosome structure and cytotoxic phenomena in malignant melanoma. **Neoplasma**, v. 38, n. 4, p. 393-400, 1991.

BOTTIROLI, G. *et al.* Enzyme-assisted cell photosensitization: a proposal for an efficient approach to tumor therapy and diagnosis. The rose bengal fluorogenic substrate. **Photochem Photobiol**, v. 66, n. 3, p. 374-83, 1997.

BOTTONE, M. G. *et al.* Enzyme-assisted photosensitization with rose Bengal acetate induces structural and functional alteration of mitochondria in HeLa cells. **Histochem Cell Biol**, v. 127, n. 3, p. 263-271, 2006.

BOYLE, G. M. Therapy for metastatic melanoma: an overview and update. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 11, n. 5, p. 725-37, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, 1976.

BURROWS, C. J., MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chem Rev**, v. 98, n. 3, p. 1109-1152, 1998.

BUYTAERT, E., DEWAELE, M., AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

CADET, J. *et al.* Photosensitized reactions of nucleic acids. **Biochimie**, v. 68, n. 6, p. 813-34, 1986.

CADET, J., DOUKI, T., RAVANAT, J.-L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 1, p. 9-21, 2010.

CADET, J. *et al.* Singlet oxygen oxidation of isolated and cellular DNA: product formation and mechanistic insights. **Photochem Photobiol**, v. 82, n. 5, p. 1219-25, 2006.

CADET, J., TREOULE, R. Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. **Photochem Photobiol**, v. 28, n. 4-5, p. 661-7, 1978.

CHANG, Y. M. *et al.* Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. **Intern J Epidemiol**, v. 38, n. 3, p. 814-830, 2009.

CHARKOUDIAN, L. K., FRANZ, K. J. Fe(III)-coordination properties of neuromelanin components: 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Inorg Chem**, v. 45, n. 9, p. 3657-64, 2006.

CHATTERJEE, A. *et al.* The effect of p53-RNAi and p53 knockout on human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1) activity. **FASEB J**, v. 20, n. 1, p. 112-4, 2006.

CHEDEKEL, M. R., AGIN, P. P., SAYRE, R. M. Photochemistry of pheomelanin: action spectrum for superoxide production. **Photochem Photobiol**, v. 31, n. 6, p. 553-555, 1980.

CHEDEKEL, M. R., AHENE, A. B., ZEISE, L. Melanin standard method: empirical formula 2. **Pigment Cell Res**, v. 5, n. 5 Pt 1, p. 240-6, 1992.

CHEDEKEL, M. R. *et al.* Photodestruction of pheomelanin: role of oxygen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 11, p. 5395-9, 1978.

CHEN, X. *et al.* Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. **Lasers Med Sci**, v. 26, n. 1, p. 69-78, 2011.

CHEN, Y. *et al.* Apoptosis induced by methylene-blue-mediated photodynamic therapy in melanomas and the involvement of mitochondrial dysfunction revealed by proteomics. **Cancer Sci**, v. 99, n. 10, p. 2019-27, 2008.

CHIARELLI-NETO, O. *et al.* Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 6, p. 1195-1202, 2011.

CHINTALA, S. *et al.* Slc7a11 gene controls production of pheomelanin pigment and proliferation of cultured cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 31, p. 10964-9, 2005.

CHURCH, S. L. *et al.* Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 7, p. 3113-7, 1993.

CLENNAN, E. L., PACE, A. Advances in singlet oxygen chemistry. **ChemInform**, v. 36, n. 40, 2005.

COELHO, S. G., HEARING, V. J. UVA tanning is involved in the increased incidence of skin cancers in fair-skinned young women. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, n. 1, p. 57-63, 2010.

CUNHA, E. S. *et al.* Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS levels and a differential expression of proteins as revealed by proteomic analysis. **Experim Cell Res**, v. 318, n. 15, p. 1913-25, 2012.

DAVID, S. S., O'SHEA, V. L., KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941-50, 2007.

DAVIDS, L. M., KLEEMANN, B. Combating melanoma: the use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. **Cancer Treat Rev**, v. 37, n. 6, p. 465-75, 2010.

DE ANDRADE, B. A. *et al.* Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and cyclin D1 in oral nevi and melanoma. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 3, p. 297-304, 2012.

DE OLIVEIRA, R. C. *et al.* Singlet oxygen induced mutation spectrum in mammalian cells. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 16, p. 4319-23, 1992.

DEL MARMOL, V. *et al.* Cysteine deprivation promotes eumelanogenesis in human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 107, n. 5, p. 698-702, 1996.

DEL MARMOL, V. *et al.* Glutathione depletion increases tyrosinase activity in human melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 101, n. 6, p. 871-4, 1993.

DESLEE, G. *et al.* Cigarette smoke induces nucleic-acid oxidation in lung fibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 43, n. 5, p. 576-84, 2010.

DEVASAGAYAM, T. P. *et al.* Singlet oxygen induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. **Biochim Biophys Acta**, v. 1088, n. 3, p. 409-12, 1991.

DEVASAGAYAM, T. P. *et al.* Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. **Biochem**, v. 30, n. 25, p. 6283-9, 1991.

DEWILDE, A. *et al.* Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide. **Biol Chem**, v. 379, n. 11, p. 1377-9, 1998.

DHENAUT, A., BOITEUX, S., RADICELLA, J. P. Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. **Mutat Res**, v. 461, n. 2, p. 109-18, 2000.

DI MASCIIO, P. *et al.* Singlet molecular oxygen: generation, reactivity, identification and biological effects. **J Braz Assoc Advanc Sci**, v. 47, n. 5/6, p. 15, 1995.

DI MASCIIO, P. *et al.* Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. **Biochim Biophys Acta**, v. 1007, n. 2, p. 151-7, 1989.

DINI, L. *et al.* Rose Bengal Acetate photodynamic therapy-induced autophagy. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 1048-1055, 2010.

DJAVAHERI-MERGNY, M. *et al.* Ultraviolet-A induces activation of AP-1 in cultured human keratinocytes. **FEBS Lett**, v. 384, n. 1, p. 92-6, 1996.

DORSZEWSKA, J. *et al.* Expression and polymorphisms of gene 8-oxoguanine glycosylase 1 and the level of oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. **DNA Cell Biol**, v. 28, n. 11, p. 579-88, 2009.

DUARTE, V. *et al.* Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 1, p. 46-53, 2001.

DUNFORD, R. *et al.* Interaction of melanin with carbon- and oxygen-centered radicals from methanol and ethanol. **Free Radic Biol Med**, v. 19, n. 6, p. 735-40, 1995.

EBERLE, J., WAGNER, M., MACNEIL, S. Human melanoma cell lines show little relationship between expression of pigmentation genes and pigmentary behaviour *in vitro*. **Pigment Cell Res**, v. 11, n. 3, p. 134-142, 1998.

EPE, B., HEGLER, J. Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. **Methods Enzymol**, v. 234, p. 122-31, 1994.

ESCOBAR, J. A., RUBIO, M. A., LISSI, E. A. Sod and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 3, p. 285-90, 1996.

EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M., COOKE, M. S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. **Mutation Res/Rev Mutation Res**, v. 567, n. 1, p. 1-61, 2004.

EVANS, S. *et al.* Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. **J Natl Cancer Inst**, v. 82, n. 1, p. 34-9, 1990.



EZZAHIR, A. The influence of melanins on the photoperoxidation of lipids. **J Photochem Photobiol B**, v. 3, n. 3, p. 341-9, 1989.

FELIX, C. C. *et al.* Melanin photoreactions in aerated media: electron spin resonance evidence for production of superoxide and hydrogen peroxide. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 84, n. 2, p. 335-41, 1978.

FISCHER, B. B. *et al.* The glutathione peroxidase homologous gene *Gpxh* in *Chlamydomonas reinhardtii* is upregulated by singlet oxygen produced in photosystem II. **Planta**, v. 223, n. 3, p. 583-90, 2006.

FISCHER, B. B., KRIEGER-LISZKAY, A., EGGEN, R. L. Photosensitizers neutral red (type I) and rose bengal (type II) cause light-dependent toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii* and induce the *Gpxh* gene via increased singlet oxygen formation. **Environ Sci Technol**, v. 38, n. 23, p. 6307-13, 2004.

FISCHER, B. B. *et al.* Singlet oxygen resistant 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 20, p. E1302-11, 2012.

FLORA, S. J. Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility following combined administration of N-acetylcysteine and meso 2,3-dimercaptosuccinic acid in rats. **Clin Exper Pharmacol Physiol**, v. 26, n. 11, p. 865-869, 1999.

FLORENES, V. A. *et al.* TGF-beta mediated G1 arrest in a human melanoma cell line lacking p15INK4B: evidence for cooperation between p21Cip1/WAF1 and p27Kip1. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2447-57, 1996.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochem Photobiol**, v. 54, n. 5, p. 659, 1991.

FOOTE, C. S. *Active Oxygen in Chemistry*. Blackie Academic & Professional, 1995.

FRELON, S. *et al.* Comparative study of base damage induced by gamma radiation and Fenton reaction in isolated DNA. **J Chem Soc, Perkin Transactions 1**, n. 24, p. 2866-2870, 2002.

FRELON, S. *et al.* Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. **Chem Res Toxicol**, v. 16, n. 2, p. 191-197, 2003.

FRELON, S. *et al.* High-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. **Chem Res Toxicol**, v. 13, n. 10, p. 1002-10, 2000.

FUKAE, J. *et al.* Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. **Acta Neuropathol** v. 109, n. 3, p. 256-262, 2004.

FUKUCHI, K. *et al.* DNA damage induces p21 protein expression by inhibiting ubiquitination in ML-1 cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1404, n. 3, p. 405-11, 1998.

- FUKUZUMI, S. *et al.* Electron-transfer oxidation properties of DNA bases and DNA oligomers. **J Phys Chem A**, v. 109, n. 15, p. 3285-94, 2005.
- GADDAMEEDHI, S. *et al.* Similar nucleotide excision repair capacity in melanocytes and melanoma cells. **Cancer Res**, v. 70, n. 12, p. 4922-30, 2010.
- GANDINI, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 1, p. 28-44, 2005.
- GANDINI, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 1, p. 45-60, 2005.
- GANDINI, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. **Eur J Cancer**, v. 41, n. 14, p. 2040-59, 2005.
- GARIBYAN, L., FISHER, D. E. How sunlight causes melanoma. **Cur Oncol Rep**, v. 12, n. 5, p. 319-326, 2010.
- GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **J Lipid Res**, v. 39, n. 8, p. 1529-42, 1998.
- GJERSET, R. A. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. **J Mol Histol**, v. 37, n. 5-7, p. 239-51, 2006.
- GOLAB, J. *et al.* Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. **J Biol Chem**, v. 278, n. 1, p. 407-14, 2003.
- GOMER, C. J. *et al.* Molecular, cellular, and tissue responses following photodynamic therapy. **Lasers Surg Med**, v. 8, n. 5, p. 450-63, 1988.
- GRETHER-BECK, S. *et al.* Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 25, p. 14586-91, 1996.
- GRUBER, F. *et al.* Molecular and genetic mechanisms in melanoma. **Coll Antropol**, v. 32 Suppl 2, p. 147-52, 2008.
- HAAG, W. R. *et al.* Singlet oxygen in surface waters - part i: furfuryl alcohol as a trapping agent. **Chemosphere**, v. 13, n. 5/6, p. 10, 1984.
- HALL, A. M., ORLOW, S. J. Degradation of tyrosinase induced by phenylthiourea occurs following Golgi maturation. **Pigment Cell Res**, v. 18, n. 2, p. 122-129, 2005.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.
- HANSON, D., DELEO, V. Long-wave ultraviolet light induces phospholipase activation in cultured human epidermal keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 95, n. 2, p. 158-63, 1990.

HATAHET, Z. *et al.* New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. **J Biol Chem**, v. 269, n. 29, p. 18814-20, 1994.

HE, G. *et al.* Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. **Oncogene**, v. 24, n. 18, p. 2929-43, 2005.

HEARING, V. J., LEONG, S. P. L. *From Melanocytes To Melanoma: The Progression To Malignancy*. Humana Press, 2006.

HEIKKILA, R. E., COHEN, G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. **Sci**, v. 181, n. 4098, p. 456-7, Aug 3 1973.

HENDERSON, B. W., DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol**, v. 55, n. 1, p. 145-57, 1992.

HERMES-LIMA, M. *Oxygen in biology and biochemistry*. role of free radicals functional metabolism: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 319-368.

HERRLING, T., JUNG, K., FUCHS, J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. **Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc**, v. 69, n. 5, p. 1429-1435, 2008.

HILL, B. G., BHATNAGAR, A. Protein S-glutathiolation: redox-sensitive regulation of protein function. **J Mol Cell Cardiol**, v. 52, n. 3, p. 559-67, 2012.

HILL, H. Z., HILL, G. J. Eumelanin causes DNA strand breaks and kills cells. **Pigment Cell Res**, v. 1, n. 3, p. 163-70, 1987.

HIROBE, T. *et al.* The slaty mutation affects eumelanin and pheomelanin synthesis in mouse melanocytes. **Eur J Cell Biol**, v. 85, n. 6, p. 537-549, 2006.

HONG, L., SIMON, J. D. Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. **J Phys Chem B**, v. 111, n. 28, p. 7938-47, 2007.

HOOGDUIJN, M. J. *et al.* Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. **Experim Cell Res**, v. 294, n. 1, p. 60-67, 2004.

HOUBEN, R. *et al.* High-Level Expression of Wild-Type p53 in Melanoma Cells is Frequently Associated with Inactivity in p53 Reporter Gene Assays. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22096, 2011.

HSU, M.-Y., ELDER, D., HERLYN, M. Melanoma: the Wistar Melanoma (WM) cell lines human cell culture. In: MASTERS, J. R. W.; PALSSON, B. (Ed.). Springer Netherlands, 2002. p. 259-274. (Human Cell Culture).

IMOKAWA, G. Analysis of initial melanogenesis including tyrosinase transfer and melanosome differentiation through interrupted melanization by glutathione. **J Invest Dermatol**, v. 93, n. 1, p. 100-7, 1989.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2012a Câncer de Pele do Tipo Melanoma. Disponível em : [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao) . Acesso: jan. 2012.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2012b. Estimativa de casos de câncer na região sul - 2012. Disponível em : <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaregiones.asp?ID=5> . Acesso: jan. 2012.

INCA (Instituto Nacional do Câncer), 2012c. Estimativa de casos de câncer para a região sudeste - Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/tabelaregiones.asp?ID=6> . Acesso: jan. 2012.

ITO, S. Optimization of conditions for preparing synthetic pheomelanin. **Pigment Cell Res**, v. 2, n. 1, p. 53-6, 1989.

ITO, S., JIMBOW, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas. **J Invest Dermatol**, v. 80, n. 4, p. 268-72, 1983.

ITO, S., WAKAMATSU, K. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 3, p. 582-92, 2008.

IVRY, G. B., OGLE, C. A., SHIM, E. K. Role of sun exposure in melanoma. **Dermatol Surg**, v. 32, n. 4, p. 481-492, 2006.

JARA, J. R. *et al.* The role of sulfhydryl compounds in mammalian melanogenesis: the effect of cysteine and glutathione upon tyrosinase and the intermediates of the pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 967, n. 2, p. 296-303, 1988.

JARRETT, S. G. *et al.* Metastasis suppressor NM23-H1 promotes repair of UV-induced DNA damage and suppresses UV-induced melanomagenesis. **Cancer Res**, v. 72, n. 1, p. 133-43, 2012.

JIANG, F. *et al.* Photodynamic therapy with photofrin in combination with Buthionine Sulfoximine (BSO) of human glioma in the nude rat. **Lasers Med Sci**, v. 18, n. 3, p. 128-33, 2003.

JIMBOW, K. *et al.* Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. **J Invest Dermatol**, v. 100, n. 3, p. 259S-268S, 1993.

JIMENEZ-CERVANTES, C. *et al.* Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 12, p. 2335-44, 2001.

KAHN, V., GOLAN-GOLDHIRSH, A., WHITAKER, J. R. Evidence against superoxide involvement in tyrosine hydroxylation by mushroom tyrosinase. **Phytochem**, v. 22, n. 9, p. 1875-1883, 1983.

KANETSKY, P. A. *et al.* A polymorphism in the agouti signaling protein gene is associated with human pigmentation. **Am J Hum Genet**, v. 70, n. 3, p. 770-5, 2002.

KANOFISKY, J. R. Singlet oxygen production by biological systems. **Chem Biol Interact**, v. 70, n. 1-2, p. 1-28, 1989.

KASTAN, M. B. *et al.* Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. **Cancer Res**, v. 51, n. 23 Pt 1, p. 6304-11, 1991.

KAUFFMANN, A. *et al.* High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients. **Oncogene**, v. 27, n. 5, p. 565-73, 2008.

KEENEY, P. M. *et al.* Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **J Neurosci**, v. 26, n. 19, p. 5256-64, 2006.

KENNEDY, C. *et al.* Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. **J Invest Dermatol**, v. 117, n. 2, p. 294-300, 2001.

KENNEDY, L. J. *et al.* Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. **Chem Res Toxicol**, v. 10, n. 4, p. 386-92, 1997.

KERTAT, K. *et al.* The Gln/Gln genotype of XPD codon 751 as a genetic marker for melanoma risk and Lys/Gln as an important predictor for melanoma progression: a case control study in the Swedish population. **Oncol Rep**, v. 20, n. 1, p. 179-83, 2008.

KHAN, A. U., MEI, Y. H., WILSON, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 23, p. 11426-7, 1992.

KHLGATIAN, M. K. *et al.* Tyrosinase gene expression is regulated by p53. **J Invest Dermatol**, v. 118, n. 1, p. 126-32, 2002.

KIESSLICH, T. *et al.* Differential effects of glucose deprivation on the cellular sensitivity towards photodynamic treatment-based production of reactive oxygen species and apoptosis-induction. **FEBS Lett**, v. 579, n. 1, p. 185-90, 2005.

KIM, S. Y., KIM, E. J., PARK, J. W. Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in Escherichia coli. **J Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 4, p. 353-7, 2002.

KIM, S. Y., KWON, O. J., PARK, J. W. Inactivation of catalase and superoxide dismutase by singlet oxygen derived from photoactivated dye. **Biochimie**, v. 83, n. 5, p. 437-44, 2001.

KIM, S. Y., LEE, S. M., PARK, J.-W. Antioxidant enzyme inhibitors enhance singlet oxygen-induced cell death in HL-60 cells. **Free Radic Res**, v. 40, n. 11, p. 1190-1197, 2006.

KIM, Y. J., UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cell Mol Life Sci**, v. 62, n. 15, p. 1707-1723, 2005.

KINNAERT, E. *et al.* Cysteine but not glutathione modulates the radiosensitivity of human melanoma cells by affecting both survival and DNA damage. **Pigment Cell Res**, v. 17, n. 3, p. 275-80, 2004.

KIPP, C., YOUNG, A. R. The soluble eumelanin precursor 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid enhances oxidative damage in human keratinocyte DNA after UVA irradiation. **Photochem Photobiol**, v. 70, n. 2, p. 191-8, 1999.

KLOTZ, L. O., BRIVIBA, K., SIES, H. Singlet oxygen mediates the activation of JNK by UVA radiation in human skin fibroblasts. **FEBS Lett**, v. 408, n. 3, p. 289-91, 1997.

KLOTZ, L. O., HOLBROOK, N. J., SIES, H. UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. **Curr Probl Dermatol**, v. 29, p. 95-113, 2001.

KOBAYASHI, T. *et al.* Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. **J Cell Sci**, v. 108, p. 2301-9, 1995.

KOCHEVAR, I. E., REDMOND, R. W. Photosensitized production of singlet oxygen. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 20-8, 2000.

KOGA, S., NAKANO, M., TERO-KUBOTA, S. Generation of superoxide during the enzymatic action of tyrosinase. **Arch Biochem Biophys**, v. 292, n. 2, p. 570-5, 1992.

KOLB, A. M. *et al.* Determination of pheomelanin by measurement of aminohydroxyphenylalanine isomers with high-performance liquid chromatography. **Anal Biochem**, v. 252, n. 2, p. 293-8, 1997.

KOMAROV, D. A. *et al.* Superoxide and hydrogen peroxide formation during enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. **Free Radic Res**, v. 39, n. 8, p. 853-858, 2005.

KORYTOWSKI, W. *et al.* Mechanism of dismutation of superoxide produced during autooxidation of melanin pigments. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 131, n. 2, p. 659-65, 1985.

KORYTOWSKI, W. *et al.* Photoinduced generation of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. **Photochem Photobiol**, v. 45, n. 2, p. 185-190, 1987.

KORYTOWSKI, W., SARNA, T. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. **J Biol Chem**, v. 265, n. 21, p. 12410-6, 1990.

KRAEMER, K. H. *et al.* The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. **Arch Dermatol**, v. 130, n. 8, p. 1018-21, 1994.

KROL, E. S., LIEBLER, D. C. Photoprotective actions of natural and synthetic melanins. **Chem Res Toxicol**, v. 11, n. 12, p. 1434-40, 1998.

KUENG, W., SILBER, E., EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal Biochem**, v. 182, n. 1, p. 16-9, 1989.

KVAM, E., TYRRELL, R. M. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 12, p. 2379-84, 1997.

KVAM, E., TYRRELL, R. M. The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 113, n. 2, p. 209-13, 1999.

KWON, H. Y. *et al.* Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the agouti gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 21, p. 9760-4, 1994.

LAND, E. J. *et al.* Rate constants for the first two chemical steps of eumelanogenesis. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 5, p. 487-93, 2003.

LAND, E. J., RILEY, P. A. Spontaneous redox reactions of dopaquinone and the balance between the eumelanin and pheomelanin pathways. **Pigment Cell Res**, v. 13, n. 4, p. 273-7, 2000.

LE PAPE, E. *et al.* Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 4, p. 477-86, 2008.

LEDFORD, H. K., CHIN, B. L., NIYOGI, K. K. Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Eukaryot Cell**, v. 6, n. 6, p. 919-30, 2007.

LEE, M. R. *et al.* Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. **J Biol Chem**, v. 279, n. 11, p. 9857-66, 2004.

LI, W., MELTON, D. W. Cisplatin regulates the MAPK kinase pathway to induce increased expression of DNA repair gene ERCC1 and increase melanoma chemoresistance. **Oncogene**, 2011.

LI, Y., TRUSH, M. A. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 7, p. 1303-11, 1993.

LLOYD, D. R., CARMICHAEL, P. L., PHILLIPS, D. H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. **Chem Res Toxicol**, v. 11, n. 5, p. 420-7, 1998.

MA, W. J., CAO, E. H., QIN, J. F. The involvement of singlet oxygen in copper-phenanthroline/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA base damage: a chemiluminescent study. **Redox Rep**, v. 4, n. 6, p. 271-6, 1999.

MAGI, B. *et al.* Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 8, p. 842-52, 2004.

MARESCA, V. *et al.* MC1R stimulation by alpha-MSH induces catalase and promotes its re-distribution to the cell periphery and dendrites. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 23, n. 2, p. 263-75, 2010.

MARESCA, V. *et al.* UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 1, p. 182-90, 2006.

MARESCA, V. *et al.* Correlation between melanogenic and catalase activity in in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 2, p. 200-5, 2008.

MARESCA, V. *et al.* Ferritin light chain down-modulation generates depigmentation in human metastatic melanoma cells by influencing tyrosinase maturation. **J Cell Physiol**, v. 206, n. 3, p. 843-848, 2006.

MARQUEZ-RODAS, I. *et al.* A new era in the treatment of melanoma: from biology to clinical practice. **Clin Transl Oncol**, v. 13, n. 11, p. 787-92, 2011.

MARROT, L. *et al.* The human melanocyte as a particular target for UVA radiation and an endpoint for photoprotection assessment. **Photochem Photobiol**, v. 69, n. 6, p. 686-93, 1999.

MARS, U., LARSSON, B. S. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. **Pigment Cell Res**, v. 12, n. 4, p. 266-74, 1999.

MARTINEZ, G. R. *et al.* [<sup>18</sup>O]-labeled singlet oxygen as a tool for mechanistic studies of 8-oxo-7,8-dihydroguanine oxidative damage: detection of spiroiminodihydantoin, imidazolone and oxazolone derivatives. **Biol Chem**, v. 383, n. 3-4, p. 607-17, 2002.

MARTINEZ, G. R. *et al.* Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of <sup>18</sup>O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. **J Amer Chem Soc**, v. 122, n. 41, p. 10212-10213, 2000.

MASSI, D. *et al.* Naevus-associated melanomas: cause or chance? **Melanoma Res**, v. 9, n. 1, p. 85-91, 1999.

MASTORE, M., KOHLER, L., NAPPI, A. J. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. **FEBS J**, v. 272, n. 10, p. 2407-2415, 2005.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, 1969.



MENDES, G. L., KOIFMAN, R. J., KOIFMAN, S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. **J Toxicol Environ Health A**, v. 73, n. 13-14, p. 850-7, 2010.

MEYSKENS, F. L., JR. *et al.* Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 6, p. 799-808, 2001.

MICHAELS, M. L. *et al.* A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. **Biochem**, v. 31, n. 45, p. 10964-8, 1992.

MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. Melanoma. **N Engl J Med**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MILLER, D. M., BUETTNER, G. R., AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radic Biol Med**, v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.

MILLIKAN, R. C. *et al.* Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and risk of multiple primary melanoma: the genes environment and melanoma study. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 610-8, 2006.

MIRANDA, M., BOTTI, D., DI COLA, M. Possible genotoxicity of melanin synthesis intermediates: tyrosinase reaction products interact with DNA in vitro. **Mol Gen Genet**, v. 193, n. 3, p. 395-9, 1984.

MIYAMOTO, S. *et al.* Biological hydroperoxides and singlet molecular oxygen generation. **IUBMB Life**, v. 59, n. 4-5, p. 322-31, 2007.

MO, J. *et al.* Chronic arsenic exposure and oxidative stress: OGG1 expression and arsenic exposure, nail selenium, and skin hyperkeratosis in Inner Mongolia. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 6, p. 835-41, 2006.

MOAN, J., DAHLBACK, A., SETLOW, R. B. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. **Photochem Photobiol**, v. 70, n. 2, p. 243-7, 1999.

MOHAMMED, M. Z. *et al.* Development and evaluation of human AP endonuclease inhibitors in melanoma and glioma cell lines. **Br J Cancer**, v. 104, n. 4, p. 653-63, 2011.

MOJAMDAR, M., ICHIHASHI, M., MISHIMA, Y. Effect of DOPA-loading on glutathione-dependent 5-S-cysteinyl-dopa genesis in melanoma cells *in vitro*. **J Invest Dermatol**, v. 78, n. 3, p. 224-6, 1982.

MORGAN, P. E., DEAN, R. T., DAVIES, M. J. Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 4, p. 484-96, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUNOZ-MUNOZ, J. L. *et al.* Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 7, p. 1017-29, 2009.

MUNOZ-MUNOZ, J. L. *et al.* Generation of hydrogen peroxide in the melanin biosynthesis pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 7, p. 1017-1029, 2009.

NAPPI, A. J., VASS, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Melanoma Res**, v. 6, n. 5, p. 341-9, 1996.

NEUMANN, C. A., CAO, J., MANEVICH, Y. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. **Cell Cycle**, v. 8, n. 24, p. 4072-8, 2009.

NIEDRE, M., PATTERSON, M. S., WILSON, B. C. Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells *in vitro* and tissues in vivo. **Photochem Photobiol**, v. 75, n. 4, p. 382-91, 2002.

NIKOLAOU, V. A. *et al.* Melanoma: new insights and new therapies. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 3, p. 854-63, 2012.

NOONAN, F. P. *et al.* Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nat Commun**, v. 3, p. 884, 2012.

OTEIZA, P. I. *et al.* 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Arch Biochem Biophys**, v. 316, n. 1, p. 607-11, 1995.

OTSU, K. *et al.* An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. **Biochem J**, v. 389, n. Pt 1, p. 197-206, 2005.

PANICH, U. *et al.* UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. **J Photochem Photobiol B**, v. 108, p. 16-22, 2012.

PANZARINI, E., TENUZZO, B., DINI, L. Photodynamic therapy-induced apoptosis of HeLa cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1171, n. 1, p. 617-626, 2009.

PARAISO, K. H. *et al.* PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. **Cancer Res**, v. 71, n. 7, p. 2750-60, 2011.

PERRY, G., CASH, A. D., SMITH, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. **J Biomed Biotechnol**, v. 2, n. 3, p. 120-123, 2002.

PESKIN, ALEXANDER V. *et al.* Removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3. **Biochem J**, v. 432, n. 2, p. 313-321, 2010.

PICARDO, M. *et al.* Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 107, n. 3, p. 322-6, 1996.

PIERLOT, C. *et al.* Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. **Methods Enzymol**, v. 319, p. 3-20, 2000.

POTTS, A. M., AU, P. C. The affinity of melanin for inorganic ions. **Exp Eye Res**, v. 22, n. 5, p. 487-91, 1976.

PRAT, F., HOU, C.-C., FOOTE, C. S. Determination of the quenching rate constants of singlet oxygen by derivatized nucleosides in nonaqueous solution. **J Am Chem Soc**, v. 119, n. 21, p. 5051-5052, 1997.

RADAK, Z., BOLDOGH, I. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine: Links to gene expression, aging, and defense against oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 4, p. 587-596, 2010.

RAHMANTO, A. S. *et al.* Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 8, p. 1071-1078, 2010a.

RAHMANTO, A. S. *et al.* Cellular effects of photogenerated oxidants and long-lived, reactive, hydroperoxide photoproducts. **Free Radic Biol Med**, v. 49, n. 10, p. 1505-1515, 2010b.

RAVANAT, J.-L., CADET, J. Reaction of singlet oxygen with 2'-deoxyguanosine and dna. isolation and characterization of the main oxidation products. **Chem Res Toxicol**, v. 8, n. 3, p. 379-388, 1995.

RAVANAT, J.-L. *et al.* Singlet oxygen oxidation of 2'-deoxyguanosine. Formation and mechanistic insights. **Tetrahedron**, v. 62, n. 46, p. 10709-10715, 2006.

RAVANAT, J.-L. *et al.* Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. **Helvetica Chim Acta**, v. 84, n. 12, p. 3702-3709, 2001.

RAVANAT, J. *et al.* Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. **Arch Biochem Biophys**, v. 423, n. 1, p. 23-30, 2004.

RAVANAT, J. L. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. **J Biol Chem**, v. 275, n. 51, p. 40601-40604, 2000.

RAVANAT, J. L. *et al.* Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. **Biol Chem**, v. 385, n. 1, p. 17-20, 2004.

RHODES, A. R. *et al.* Melanosomal alterations in dysplastic melanocytic nevi. A quantitative, ultrastructural investigation. **Cancer**, v. 61, n. 2, p. 358-69, 1988.

RIGEL, D. S., RUSSAK, J., FRIEDMAN, R. The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 5, p. 301-16, 2010.

RILEY, P. A. Melanin. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 29, n. 11, p. 1235-9, 1997.

ROZANOWSKA, M. *et al.* Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 5-6, p. 518-25, 1999.

RYTER, S. W., TYRRELL, R. M. Singlet molecular oxygen ( $(^1\text{O}_2)$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radic Biol Med**, v. 24, n. 9, p. 1520-34, 1998.

SAENKHAM, P. *et al.* *Agrobacterium tumefaciens* iron superoxide dismutases have protective roles against singlet oxygen toxicity generated from illuminated Rose Bengal. **FEMS Microbiol Lett**, v. 289, n. 1, p. 97-103, 2008.

SAHA, T. *et al.* Transcriptional regulation of the base excision repair pathway by BRCA1. **J Biol Chem**, v. 285, n. 25, p. 19092-19105, 2010.

SAKAI, C. *et al.* Modulation of murine melanocyte function *in vitro* by agouti signal protein. **EMBO J**, v. 16, n. 12, p. 3544-52, 1997.

SALMENA, L., CARRACEDO, A., PANDOLFI, P. P. Tenets of PTEN tumor suppression. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 403-14, 2008.

SALOPEK, T. G. *et al.* Dysplastic melanocytic nevi contain high levels of pheomelanin: quantitative comparison of pheomelanin/eumelanin levels between normal skin, common nevi, and dysplastic nevi. **Pigment Cell Res**, v. 4, n. 4, p. 172-9, 1991.

SANDER, C. S. *et al.* Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 5, p. 913-22, 2003.

SARNA, T., MENON, I. A., SEALY, R. C. Photosensitization of melanins: a comparative study. **Photochem Photobiol**, v. 42, n. 5, p. 529-32, 1985.

SARNA, T. *et al.* Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. **Biochim Biophys Acta**, v. 883, n. 1, p. 162-7, 1986.

SATO, C., ITO, S., TAKEUCHI, T. Enhancement of pheomelanogenesis by L-dopa in the mouse melanocyte cell line, TM10, *in vitro*. **J Cell Sci**, v. 87 ( Pt 4), p. 507-12, 1987.

SCHAFFER, J. V., BOLOGNIA, J. L. The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. **Arch Dermatol**, v. 137, n. 11, p. 1477-85, 2001.

SCHARFFETTER-KOCHANKE, K. *et al.* Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. **FEBS Lett**, v. 331, n. 3, p. 304-6, 1993.

SCHNEIDER, J. E. *et al.* Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy 2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 3, p. 631-5, 1990.

SCHULZ, I. *et al.* Oxidative DNA base damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonucleases and mutagenicity. **Mutat Res**, v. 461, n. 2, p. 145-56, 2000.

SCOTT, M. C. *et al.* Human melanocortin 1 receptor variants, receptor function and melanocyte response to UV radiation. **J Cell Sci**, v. 115, n. Pt 11, p. 2349-55, 2002.

SEALY, R. C. Radicals in melanin biochemistry. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 479-83, 1984.

SEALY, R. C. *et al.* Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. **Photochem Photobiol**, v. 40, n. 4, p. 453-9, 1984.

SHAO, J. *et al.* Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitiser ZnPcS<sub>(2)</sub>P<sub>(2)</sub>: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest. **Eur J Cancer**, 2012.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res**, v. 60, n. 14, p. 3689-95, 2000.

SHEU, C., FOOTE, C. S. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxyguanosine") formed by photooxidation of a guanosine derivative. **J Am Chem Soc**, v. 117, n. 24, p. 6439-6442, 1995.

SHIEH, S. Y. *et al.* DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 325-34, 1997.

SICHEL, G. *et al.* In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O<sub>2</sub><sup>•</sup>(.). **Free Radic Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 1991.

SIES, H. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. **Mutat Res**, v. 299, n. 3-4, p. 183-91, 1993.

SKENDER-KALNENAS, T. M., ENGLISH, D. R., HEENAN, P. J. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? **J Am Acad Dermatol**, v. 33, n. 6, p. 1000-7, 1995.

SMIT, N. P. *et al.* Melanogenesis in cultured melanocytes can be substantially influenced by L-tyrosine and L-cysteine. **J Invest Dermatol**, v. 109, n. 6, p. 796-800, 1997.

SMIT, N. P. *et al.* Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage--study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 3, p. 550-5, 2008.

SOLDANI, C. *et al.* Apoptosis in tumour cells photosensitized with Rose Bengal acetate is induced by multiple organelle photodamage. **Histochem Cell Biol**, v. 128, n. 5, p. 485-495, 2007.

SOMMER, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 3, p. 411-21, 2011.

SONG, L. *et al.* Identification of DNA repair gene *Ercc1* as a novel target in melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 24, n. 5, p. 966-71, 2011.

STEINBECK, M. J., KHAN, A. U., KARNOVSKY, M. J. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. **J Biol Chem**, v. 267, n. 19, p. 13425-33, 1992.

SULEM, P. *et al.* Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. **Nat Genet**, v. 40, n. 7, p. 835-7, 2008.

SWALWELL, H. *et al.* Investigating the role of melanin in UVA/UVB- and hydrogen peroxide-induced cellular and mitochondrial ROS production and mitochondrial DNA damage in human melanoma cells. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 3, p. 626-34, 2012.

TADA, M., KOHNO, M., NIWANO, Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. **J Clin Biochem Nutr**, v. 46, n. 3, p. 224-8, 2010.

TADOKORO, T. *et al.* UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. **FASEB J**, v. 17, n. 9, p. 1177-9, 2003.

TCHOU, J. *et al.* Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 15318-24, 1994.

THERUVATHU, J. A. *et al.* The oxidatively induced DNA lesions 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine and 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine are strongly resistant to acid-induced hydrolysis of the glycosidic bond. **Mech Ageing Dev**, v. 128, n. 9, p. 494-502, 2007.

THOMPSON, J. F., SCOLYER, R. A., KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem**, v. 27, n. 3, p. 502-22, 1969.

TOTA, M. R. *et al.* Molecular interaction of Agouti protein and Agouti-related protein with human melanocortin receptors. **Biochem**, v. 38, n. 3, p. 897-904, 1999.

TRETYAKOVA, N. Y., WISHNOK, J. S., TANNENBAUM, S. R. Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesions at guanine nucleobases: chemical stability and recognition by the Fpg DNA repair enzyme. **Chem Res Toxicol**, v. 13, n. 7, p. 658-64, 2000.

TUCKER, M. A. Melanoma Epidemiology. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 23, n. 3, p. 383-395, 2009.

TUONG, W., CHENG, L. S., ARMSTRONG, A. W. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. **Dermatol Clin**, v. 30, n. 1, p. 113-24, 2012.

URSINI, F., BINDOLI, A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. **Chem Phys Lipids**, v. 44, n. 2-4, p. 255-76, 1987.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, 2002.

VILE, G. F., TANEW-ILITSCHIEW, A., TYRRELL, R. M. Activation of NF-kappa B in human skin fibroblasts by the oxidative stress generated by UVA radiation. **Photochem Photobiol**, v. 62, n. 3, p. 463-8, 1995.

VILLARAMA, C. D., MAIBACH, H. I. Glutathione as a depigmenting agent: an overview. **Int J Cosmet Sci**, v. 27, n. 3, p. 147-53, 2005.

VOISEY, J., KELLY, G., VAN DAAL, A. Agouti signal protein regulation in human melanoma cells. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 1, p. 65-71, 2003.

WAKAMATSU, K., ITO, S., REES, J. L. The usefulness of 4-amino-3-hydroxyphenylalanine as a specific marker of pheomelanin. **Pigment Cell Res**, v. 15, n. 3, p. 225-32, 2002.

WANG, A. *et al.* Photoprotection by porcine eumelanin against singlet oxygen production. **Photochem Photobiol**, v. 84, n. 3, p. 679-82, 2008.

WANG, H. P. *et al.* Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against singlet oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. **Free Radic Biol Med**, v. 30, n. 8, p. 825-35, 2001.

WANG, H. T., CHOI, B., TANG, M. S. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photoproducts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 27, p. 12180-5, 2010.

WANG, S. Q., HASHEMI, P. Noninvasive Imaging Technologies in the Diagnosis of Melanoma. **Sem Cut Med Surg**, v. 29, n. 3, p. 174-184, 2010.

WANG, S. Q. *et al.* Current technologies for the in vivo diagnosis of cutaneous melanomas. **Clin Dermatol**, v. 22, n. 3, p. 217-222, 2004.

WENCZL, E. *et al.* (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. **J Invest Dermatol**, v. 111, n. 4, p. 678-82, 1998.

WOOD, Z. A. *et al.* Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends Biochem Sci**, v. 28, n. 1, p. 32-40, 2003.

WRIGHT, A. Photo-oxidation of cells generates long-lived intracellular protein peroxides. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 6, p. 637-647, 2003.

WRIGHT, A. *et al.* Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. **Photochem Photobiol**, v. 76, n. 1, p. 35-46, 2002.

YAMAGUCHI, Y., BRENNER, M., HEARING, V. J. The regulation of skin pigmentation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 38, p. 27557-27561, 2007.

YAMAMOTO, K. *et al.* Site-specific DNA damage induced by cobalt(II) ion and hydrogen peroxide: role of singlet oxygen. **Chem Res Toxicol**, v. 2, n. 4, p. 234-239, 1989.

YU, S.-B. *et al.* Analysis of plasmid DNA damage induced by melanin with capillary electrophoresis. **J Pharm Biomed Anal**, v. 43, n. 3, p. 816-821, 2007.

ZENG, Y. X., EL-DEIRY, W. S. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression by p53-independent pathways. **Oncogene**, v. 12, n. 7, p. 1557-64, 1996.

ZHARKOV, D. O. Base excision DNA repair. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 10, p. 1544-65, 2008.



## 9. OUTRAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O DOUTORADO

- 2009 – Apresentação de poster intitulado “*Effect of Pheomelanin and Singlet Oxygen on DNA Damage*” durante o congresso “*Free Radicals and Antioxidants in Chile 2009*” – Santiago, Chile.
- 2010 – Apresentação de pôster intitulado “*Artefact in Pheomelanin Synthesis from Tyrosinase Protocol*” durante a XXXIX Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular – Foz do Iguaçu - PR.
- 2010 - Participação da Comissão Organizadora do “1º *Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular*” – UFPR.
- 2010 - Participante do Curso “*Ensaio Cometa e Análise de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real*”, promovido pela SBMCTA (Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental) / Ribeirão Preto.
- 2011 - Palestrante durante o “2º Curso de Inverno de Bioquímica e Biologia Molecular” – UFPR (Palestra intitulada: “*Radicais Livres: para o bem ou para o mal?*”).
- 2011 - Apresentação de Pôster intitulado no “*VII Meeting of the SFRBM South American Group*” - São Pedro / SP, premiado pelo *Young Investigator Awards*.
- 2011 - Participação como Banca Examinadora durante o 19º Evento de Iniciação Científica – EVINCI.

## **10. ANEXOS**

- Trabalho científico publicado, resultante desta tese.



## Original Contribution

# Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen

Andréia Akemi Suzukawa<sup>a</sup>, Alessandra Vieira<sup>a</sup>, Sheila Maria Brochado Winnischofer<sup>a</sup>,  
Alexsandra Cristina Scalfo<sup>b</sup>, Paolo Di Mascio<sup>b</sup>, Ana Maria da Costa Ferreira<sup>c</sup>, Jean-Luc Ravanat<sup>d</sup>,  
Daniela de Luna Martins<sup>e</sup>, Maria Eliane Merlin Rocha<sup>a</sup>, Glaucia Regina Martinez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, 81.531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>d</sup> Institut Nanosciences et Cryogénie, CEA-Grenoble, Grenoble, France

<sup>e</sup> Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 August 2011

Revised 17 February 2012

Accepted 24 February 2012

Available online 6 March 2012

## Keywords:

Melanin

Singlet oxygen

Scavenger

DNA damage

DNA minor groove binder

DNA repair

Free radicals

## ABSTRACT

Melanins have been associated with the development of melanoma and its resistance to photodynamic therapy (PDT). Singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), which is produced by ultraviolet A solar radiation and the PDT system, is also involved. Here, we investigated the effects that these factors have on DNA damage and repair. Our results show that both types of melanin (eumelanin and pheomelanin) lead to DNA breakage in the absence of light irradiation and that eumelanin is more harmful than pheomelanin. Interestingly, melanins were found to bind to the minor grooves of DNA, guaranteeing close proximity to DNA and potentially causing the observed high levels of strand breaks. We also show that the interaction of melanins with DNA can impair the access of repair enzymes to lesions, contributing to the perpetuation of DNA damage. Moreover, we found that after melanins interact with  $^1\text{O}_2$ , they exhibit a lower ability to induce DNA breakage; we propose that these effects are due to modifications of their structure. Together, our data highlight the different modes of action of the two types of melanin. Our results may have profound implications for cellular redox homeostasis, under conditions of induced melanin synthesis and irradiation with solar light. These results may also be applied to the development of protocols to sensitize melanoma cells to PDT.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Melanins are ubiquitous biological pigments that are formed by amorphous polymers and are synthesized by melanocytes. They confer color to the skin, eyes, and hair. There are two types of melanin: brown-black eumelanin and reddish-yellow pheomelanin. Pheomelanin is composed of benzothiazine units, derived from the oxidation of cysteinyl-dopas, and contains nitrogen and sulfur atoms in its structure (Fig. 1A), whereas eumelanin contains only nitrogen heteroatoms and is built from dihydroxyindole (DHI) and dihydroxyindole carboxylic acid (DHICA) units [1] (Fig. 1B). The initial step in the synthesis of

both eu- and pheomelanin is the L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) oxidation or tyrosine hydroxylation catalyzed by tyrosinase, which carries in its active site two histidine-coordinated copper ions [2] that are essential for its activity [3,4].

Many studies have focused on the chemical properties of melanins, such as their ability to absorb light [5], bind to ions and to other molecules [6,7], and exhibit redox activity [8–10]. It was found that melanins act as photosensitizers under UV radiation, thereby generating reactive oxygen species (ROS), superoxide anion, and hydrogen peroxide [11–13]. Interestingly, although melanins have been associated with the generation of ROS, they have also been described as scavengers of a variety of oxidizing and reducing radicals [9,14].

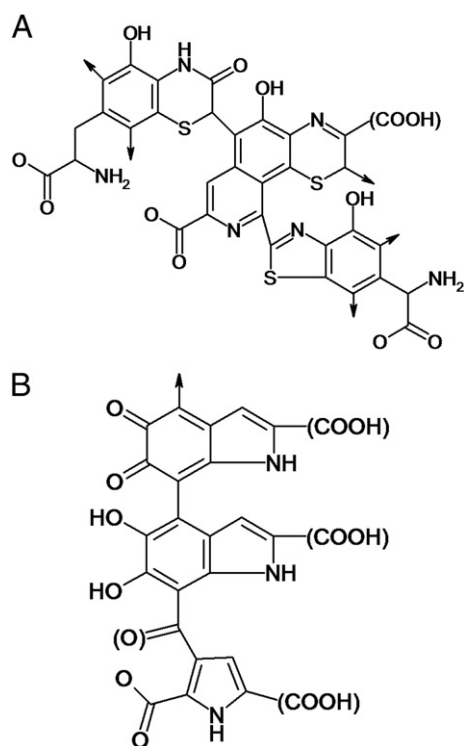
There are notable differences in the redox properties of the two classes of melanin, in both cellular and *in vitro* environments. In general, eumelanin is thought to have a protective role [8,15–17], whereas pheomelanin is almost always considered harmful [5,16,18,19].

Melanins have been implicated in the development of melanoma. It has been previously shown that dysplastic nevi, a phenotype that presents before melanoma development, have abnormal melanosomes, the organelles that synthesize melanin [20,21]. As a result, melanogenic intermediates and related enzymes can leak out of the melanosomes

**Abbreviations used:** PDT, photodynamic therapy;  $^1\text{O}_2$ , singlet molecular oxygen; UVA, ultraviolet radiation A; DHI, dihydroxyindole; DHICA, dihydroxyindole carboxylic acid; L-DOPA, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; ROS, reactive oxygen species; 8-oxodGuo, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine; ThdGly, 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine; DMSO, dimethyl sulfoxide; SOD, superoxide dismutase; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; MB, methylene blue; EndoIII, endonuclease III; FPG, formamidopyrimidine-DNA glycosylase; HPLC, high-performance liquid chromatography; DHPN, N,N'-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropylamide; SDS, sodium dodecyl sulfate; L, linear; OC, open circular; SC, supercoiled; EPR, electron paramagnetic resonance; LED, light-emitting diode; UV-Vis, ultraviolet-visible; AP site, apurinic/apyrimidinic site.

\* Corresponding author. Fax: +55 041 32662042.

E-mail address: [grmartinez@ufpr.br](mailto:grmartinez@ufpr.br) (G.R. Martinez).



**Fig. 1.** Molecular structures of the monomers of (A) pheomelanin and (B) eumelanin. Sites of attachment of the other units are indicated with arrows.

[22], bringing melanins in close proximity to DNA. The possibility of a melanin–DNA interaction was considered in the study by Kipp and Young [23]. They found that DHICA sensitized keratinocytes to DNA damage induced by UVA irradiation. Additionally, Hill and Hill [24] demonstrated that DNA strand breakage can occur after B16CL4 melanoma cells are exposed to eumelanin in the absence of irradiation.

Exposure to UV radiation, in particular UVA (320–400 nm), is considered a risk factor for melanoma [25–27]. The effects of UVA radiation have largely been associated with the generation of  $^1\text{O}_2$  [28,29], a ROS that damages cells by oxidizing amino acid residues [30,31], lipids [32], and DNA [33,34]. With respect to DNA,  $^1\text{O}_2$  reacts preferentially with guanine residues, generating 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine [35], which is commonly referred to as 8-oxodGuo. This modified base can pair with adenine, leading to G → T transversions [36,37]. In general, studies on the effect of  $^1\text{O}_2$  on DNA use either photosensitizers [38–40] or thermally dissociable endoperoxides [39,41–43] as  $^1\text{O}_2$  sources. The latter source has the advantage of eliminating additional variables, such as sample overheating or the generation of radicals by irradiation, and can also provide a controlled and uniform  $^1\text{O}_2$  release.

In this work, we have explored the possibility that melanins may interact with DNA and  $^1\text{O}_2$ , and our results contribute to a better understanding of the effects of  $^1\text{O}_2$  and melanins on DNA damage.

## Materials and methods

### Reagents

Synthetic eumelanin, mushroom tyrosinase, D-mannitol, deferoxamine mesylate salt, dimethyl sulfoxide (DMSO), deuterium oxide, superoxide dismutase (SOD), catalase, bathocuproine disulfonic acid disodium salt, L-DOPA, Chelex 100 chelating resin, bathophenanthroline sulfonate, ferritin from horse spleen, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from Sigma–Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Sodium azide, disodium hydrogen phosphate, methylene blue (MB), and L-cysteine were from Merck (Darmstadt, Germany). Endonuclease III (EndoIII) and formamidopyrimidine–DNA glycosylase (FPG) enzymes

were purchased from New England Biolabs (Acton, MA, USA). Hoechst 33342 trihydrochloride was from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The pUC18 plasmid was purchased from Fermentas (Thermo Scientific). High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade methanol was purchased from J.T. Baker (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA). The agarose was from Agargen (Brazil), and the PlusOne ethidium bromide solution was from GE Healthcare–Amersham Biosciences (UK). Ultrapure water was obtained using a GEHAKA System (São Paulo, Brazil).

### Pheomelanin synthesis

Pheomelanin was synthesized as described elsewhere [44]. The reaction was started from cysteine and L-DOPA with tyrosinase; after purification, the product was verified with HPLC analysis of the hydriodic reduction products of pheomelanin according to [45].

### Endoperoxide synthesis

*N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)-1,4-naphthalenedipropanamide (DHPN) was synthesized as previously described by [42]. The endoperoxide of DHPN–DHPNO<sub>2</sub>—was prepared by MB photosensitization [46].

### DNA strand break assay and electrophoresis

The pUC18 plasmid (400 ng) was incubated under constant agitation with 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pheomelanin or eumelanin (both solubilized in 1 M NaOH) and 20 mM DHPNO<sub>2</sub> in phosphate-buffered medium (pH 7) for 2.5 h at 37 °C, protected from the light. For the mechanistic investigations, 20 mM bathocupreine, 20 mM deferoxamine, 20 mM DMSO, 200 mM mannitol, 200 mM sodium azide, 10 mM potassium iodide (KI), 1000 U  $\text{ml}^{-1}$  SOD, and/or 100 U  $\text{ml}^{-1}$  catalase were added to the reaction. To investigate base oxidation, FPG (8 U  $\text{ml}^{-1}$ ) or EndoIII (10 U  $\text{ml}^{-1}$ ) enzyme was used according to the manufacturer's protocol for 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with the addition of 65 mM Tris–HCl, pH 8.0, 1.75 mM EDTA, 10.0% Ficoll, 1.0% SDS, and 0.02% bromophenol blue). After electrophoresis in an agarose gel (1%) in TBE buffer (89 mM Tris–borate, 2 mM EDTA, pH 8.0), the samples were labeled with ethidium bromide and analyzed using densitometry and the ImageJ 1.43u software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The percentage of DNA strand breaks was measured by calculating the relative amounts of linear (L) and open circular (OC) forms of DNA, correcting for the less efficient labeling of the supercoiled (SC) form by ethidium bromide [47].

### Measurement of oxidatively damaged bases

The occurrence of lesions within DNA (8-oxodGuo and 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine (ThdGly)) was assessed as described elsewhere [48].

### EPR analysis

EPR studies were performed in a Bruker EMX instrument at 77 K (X band, 9.5 GHz, 20.31 mW, 100 kHz of frequency modulation).

### Determination of iron release from ferritin

Iron release from horse spleen ferritin (250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) was monitored in the presence of melanins (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) by measuring the increase in absorbance at 530 nm due to the formation of the  $\text{Fe}^{2+}$ –bathophenanthroline sulfonate complex, as described by Oteiza et al. [49].

### Melanin photosensitization

Melanins ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  in phosphate buffer, pH 7) were irradiated using light-emitting diode (LED) lamps at  $526 \pm 20 \text{ nm}$  (Cromatek; Cromax Eletrônica LTDA, São Paulo, Brazil) for a total dose of  $1.5$  to  $9 \text{ J/cm}^2$ . Then, the pUC18 plasmid ( $400 \text{ ng}$ ) was added to the medium, and the reaction was carried out for  $2.5 \text{ h}$  at  $37^\circ\text{C}$ , protected from the light.

### Spectra of melanins after DHPNO<sub>2</sub> incubation

The visible spectrum of the melanins ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ , in phosphate buffer, pH 7) was recorded before and after incubation for  $2.5 \text{ h}$  at  $37^\circ\text{C}$  in the presence or absence of  $20 \text{ mM}$  DHPNO<sub>2</sub>. The samples were kept in a Corning Special optical microplate, and the spectra were measured using an Infinite Tecan microplate reader.

### DHICA synthesis

DHICA was synthesized as described by Charkoudian and Franz [50].

### DHICA reaction with DHPNO<sub>2</sub> and HPLC analysis

DHICA ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was incubated with  $10 \text{ mM}$  DHPNO<sub>2</sub> for  $2.5 \text{ h}$  at  $37^\circ\text{C}$ , protected from the light, and then analyzed by HPLC (Shimadzu). A Synergy Fusion column (Phenomenex,  $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) was employed with a mobile phase of  $0.1\%$  formic acid, pH 2.7:methanol 90:10 (at  $0.5 \text{ ml/min}$ ). Detection was achieved with a UV–Vis detector ( $254 \text{ nm}$ ). At the output of the UV detector, a small fraction of the sample was directed into an MS spectrometer (micrOTOF Q-II; Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) at a flow rate of  $100 \mu\text{l min}^{-1}$ . The spectra were obtained in the positive-ion mode. The source temperature was maintained at  $180^\circ\text{C}$ , and the flow rate of the drying gas was  $6 \text{ L min}^{-1}$ . The capillary electrode potential was set to  $-4.5 \text{ kV}$ .

### Hoechst 33342 and melanin competition assay

The ability of melanin to bind to the minor grooves of DNA was evaluated by observing the reduction in the fluorescence of the Hoechst dye. Hoechst 33342 ( $2 \mu\text{M}$ ) was mixed with  $290 \text{ ng ml}^{-1}$  plasmid in a phosphate-buffered medium, and the emission spectrum of the dye was obtained in the range of  $370$  to  $600 \text{ nm}$  upon excitation at  $343 \text{ nm}$ .

### Statistical analysis

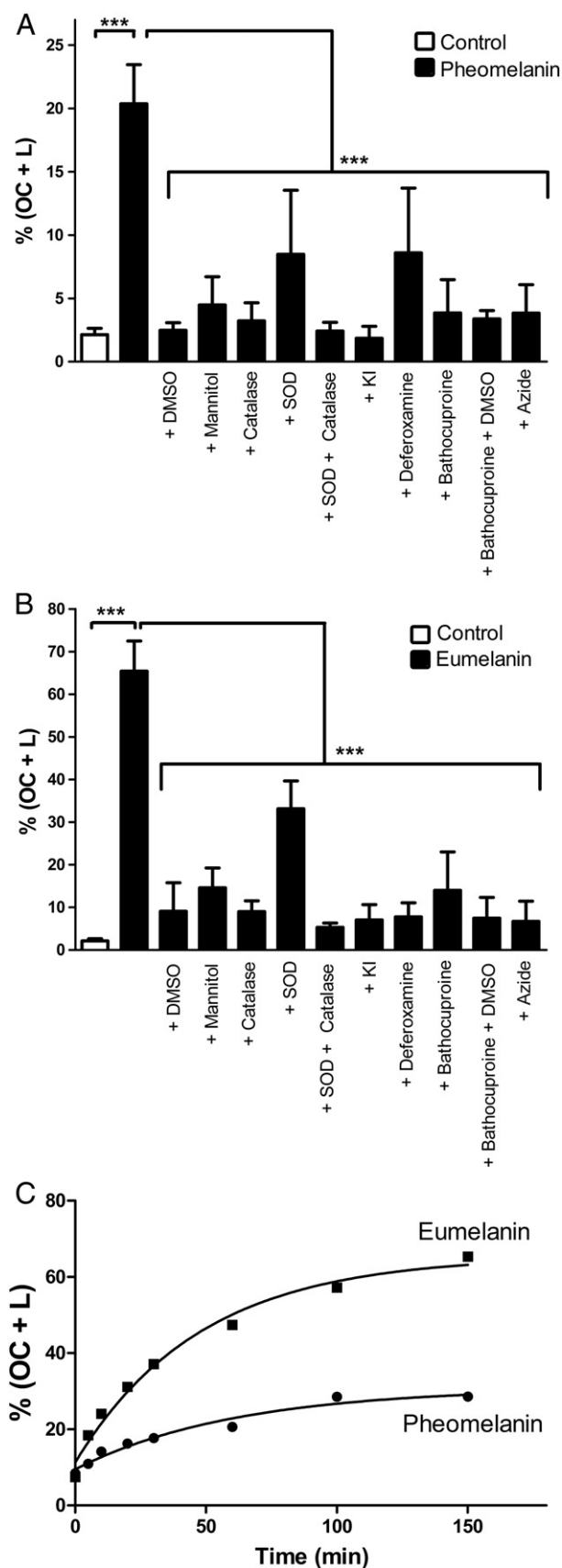
The data were analyzed with the Prisma software, using either a Student *t* test or ANOVA followed by Tukey's test, as indicated in the legend.

## Results and discussion

### Mechanism by which melanins induce DNA strand breaks

The role of melanins in DNA damage was evaluated, and the data are presented in Fig. 2. Pheomelanin (Fig. 2A) and, to a greater extent,

eumelanin (2B) were associated with DNA strand breakage. We investigated the mechanism by which pheomelanin and eumelanin could lead to DNA breakage by employing substances that could



**Fig. 2.** Effects of (A) pheomelanin and (B) eumelanin on DNA damage and investigation into the mechanism of strand breakage. pUC18 plasmid ( $400 \text{ ng}$ ) was incubated under constant agitation with  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  pheomelanin or eumelanin for  $2.5 \text{ h}$  at  $37^\circ\text{C}$ , protected from the light. To determine the mechanism,  $20 \text{ mM}$  DMSO,  $200 \text{ mM}$  mannitol,  $100 \text{ U ml}^{-1}$  catalase, and/or  $1000 \text{ U ml}^{-1}$  SOD,  $10 \text{ mM}$  KI,  $20 \text{ mM}$  deferoxamine,  $20 \text{ mM}$  bathocuproine, or  $200 \text{ mM}$  sodium azide were added to the reaction. The kinetics of breakage are shown in (C). The results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments. OC, open circular; L, linear. \*\*\* $p < 0.001$ .

inhibit the reaction in various ways. The results were similar for both melanins, so they are discussed together. The addition of catalase and KI resulted in a seven- to ninefold reduction in DNA breaks, indicating the involvement of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Indeed, *o*-diphenols such as eumelanin can undergo autooxidation, giving rise to  $\text{O}_2^{\cdot-}$  [51], which can generate  $\text{H}_2\text{O}_2$  after spontaneous dismutation or a melanin-catalyzed reduction, even in the absence of light [52]. Production of  $\text{H}_2\text{O}_2$  was also detected during the autooxidation of the melanin's precursors, DHI and DHICA [53]. Once formed,  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be further reduced by transition metals, such as  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^+$ , yielding the highly reactive  $\cdot\text{OH}$  radical through the so-called Fenton reaction. This mechanism is consistent with the abrogation of DNA strand breakage observed after the addition of DMSO and mannitol ( $\cdot\text{OH}$  scavengers) or deferoxamine and bathocupreine (chelators of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^+$ , respectively) to the reaction medium. The occurrence of DNA damage after exposure to  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  is well documented [54,55]; in this case,  $\cdot\text{OH}$  is the main reactive species involved in base oxidation [56]. As  $\text{Fe}^{2+}$  is oxidized to  $\text{Fe}^{3+}$ , the latter can be reduced back to the ferrous form by  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , thus feeding back into the Fenton reaction. The 50% reduction in breaks observed after the addition of SOD to the reaction medium could be explained by the absence of  $\text{Fe}^{2+}$  recycling; a direct action of  $\text{O}_2^{\cdot-}$  is less likely because of its poor reactivity toward DNA [57].

Notably, when copper and  $\text{H}_2\text{O}_2$  are involved in DNA damage, the mechanism is quite different from that described for iron ions, as one-electron oxidation (instead of  $\cdot\text{OH}$ ) is responsible for the damage in the presence of  $\text{Cu}^+$  [58]. When  $\text{Cu}^{2+}$  catalyzes the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -mediated oxidation of DNA,  $^1\text{O}_2$  is thought to be the main species involved [58–60]. A similar process occurs when  $\text{H}_2\text{O}_2$  is generated by a copper/hydroquinone system [61]. Considering that  $^1\text{O}_2$  is formed by  $\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ , the inhibition of DNA breakage observed after the addition of azide could be related to  $^1\text{O}_2$  quenching or to the ability of azide to chelate copper ions. There has been much discussion about the ability of  $^1\text{O}_2$  to generate single-strand DNA breaks. The most widely accepted mechanism involves the oxidation of 8-oxodGuo, which is more reactive than 2'-deoxyguanosine itself [62]. Oxaluric acid is the product of 8-oxodGuo oxidation in oligonucleotides [63], and because this lesion is more labile than 8-oxodGuo, it could be the precursor of single-strand breaks [64,65].

The involvement of  $\cdot\text{OH}$  in melanin-driven DNA damage was confirmed by measuring two types of oxidized bases: 8-oxodGuo and ThdGly. Whereas 8-oxodGuo can be formed with a variety of oxidants (including  $^1\text{O}_2$ ), ThdGly is exclusively produced from the action of  $\cdot\text{OH}$  on DNA [66]. As expected from the previous study of Ravanat et al.

[35], 8-oxodGuo but not ThdGly levels were found to be elevated upon exposure to the  $^1\text{O}_2$  generator DHPNO<sub>2</sub> (Fig. 3). When DNA was incubated with melanins, there was an increase in the levels of both 8-oxodGuo and ThdGly. This result is consistent with the idea of  $\cdot\text{OH}$  formation. The levels of 8-oxodGuo were higher in the eumelanin-treated samples than in those incubated with pheomelanin, consistent with the data from the strand-break assay.

The presence of copper and iron ions was not expected, as there are no reports of these ions in the tyrosinase protocol of pheomelanin synthesis and this protocol has been widely used for many years [7–9,67,68]. Nonetheless, the protocol does not include any steps to remove the tyrosinase from the reaction, and the pheomelanin purification requires the pH to be lowered to 3 and a wash with organic solvents. With these steps, it is likely that the copper is released from the tyrosinase and made available to bind to pheomelanin. In addition, traces of iron are known to be present in phosphate buffer [69], which is used during pheomelanin synthesis. We confirmed the presence of copper and iron ions in the pheomelanin samples with EPR analysis (Fig. 4). Although these ions were present in our samples as contaminants from synthesis, our results are still significant because melanins naturally bind to positively charged inorganic ions through their carboxyl moieties [6,70]. This property allows the melanosome to be a metal reservoir for the cell that can regulate the storage, release, and exchange of metallic ions [71]. In addition, melanoma cells are known to exhibit an increased uptake of metal ions [72]. As such, we believe that the amount of metal-free melanin in the cell could be negligible and that the biological effects of melanins are due to the metal-bound form.

Interestingly,  $\text{Cu}^{2+}$  was also detected in the EPR spectrum (Fig. 4, inset), and DNA damage was inhibited by the  $\text{Cu}^+$  chelator bathocupreine (Fig. 2). This result supports a direct involvement of melanins in the redox chemistry of copper.

We also found that melanins form stable radicals (Fig. 4), consistent with previous findings [73]. In our experiments, however, DNA breakage was nearly completely inhibited with ROS-deactivator agents, making it unlikely that melanin radicals can directly act on DNA (Figs. 2A and B).

We found that both melanins have the same mechanism of action, but it is clear that their structural differences result in an unequal ability to promote DNA breakage, as pheomelanin had milder effects than eumelanin. Moreover, in the presence of pheomelanin, the formation of DNA strand breaks was slower and achieved plateau levels before that in the presence of eumelanin (Fig. 2C).

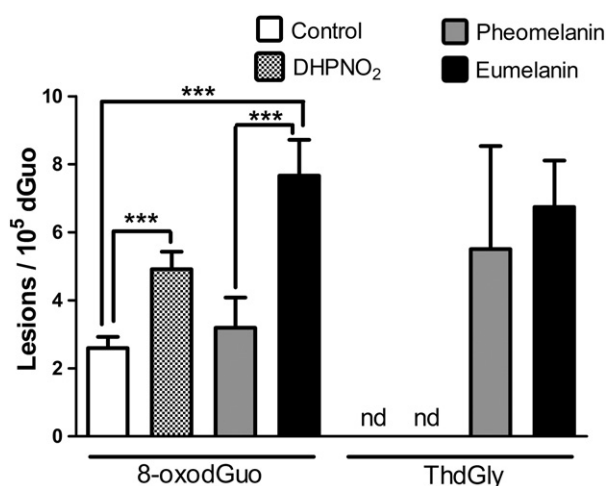


Fig. 3. Yield of oxidized nucleosides within pUC18 plasmids incubated with either melanins or DHPNO<sub>2</sub>. pUC18 plasmid was incubated under constant agitation with 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pheomelanin or eumelanin or 20 mM DHPNO<sub>2</sub> for 2.5 h at 37 °C, protected from the light. The results are expressed as the means  $\pm$  SD of two independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $p < 0.001$ ; nd, not detected.

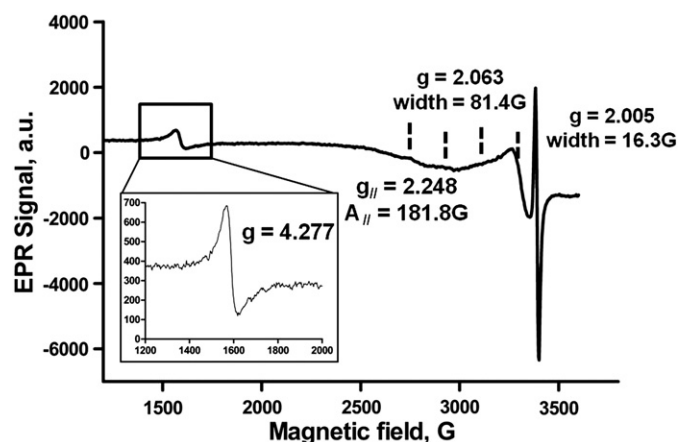


Fig. 4. EPR spectra of pheomelanin samples. The signal in  $g = 4.277$  is due to iron ions (spin 3/2). The intermediate signal, with a hyperfine structure ( $g_{||} = 2.248$ ;  $A_{||} = 181.3$  G;  $g = 2.063$ ) corresponds to copper(II) ions. The singlet signal is from the pheomelanin stable radical ( $g = 2.005$ , line width = 16.3 G).



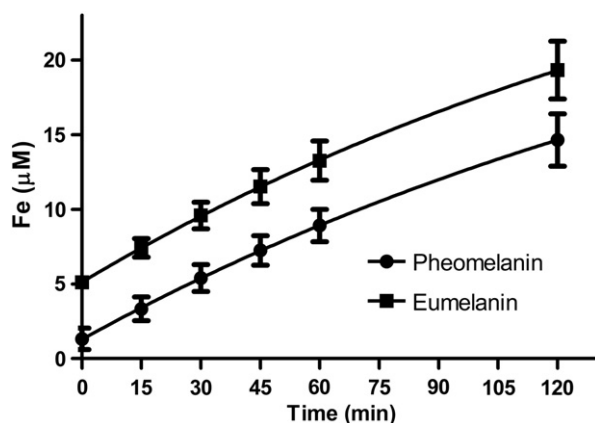
### Propagating damage: iron liberation from ferritin

We found that the main mechanism by which melanins promote DNA damage is dependent on the presence of metal ions, such as iron and copper. In addition, the metalloprotein ferritin is known to be over-expressed in metastatic melanoma [74], contributing to the progression of disease [75]. Thus, we tested whether melanins would induce the liberation of iron from ferritin. Melanins were incubated in the presence of horse spleen ferritin for 2.5 h at 37 °C. The appropriate control groups were also included to account for the iron ions that were bound to our samples. Both melanins were found to release iron from ferritin with very similar kinetics (Fig. 5). The iron ions liberated from ferritin are likely to interact with melanins, amplifying the damaging potential of these pigments and profoundly disturbing cellular redox homeostasis.

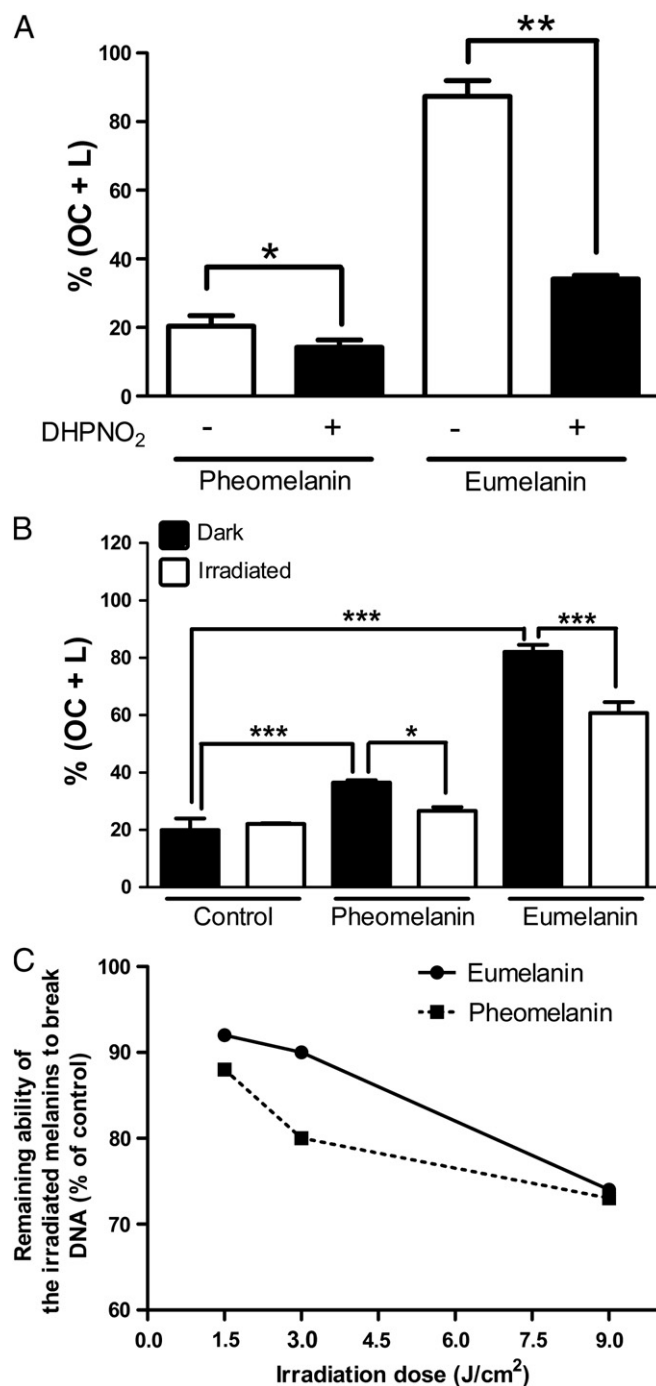
### Effect of melanin and $^1\text{O}_2$ interaction on DNA damage

The precise interaction of  $^1\text{O}_2$  and melanins with DNA and the effects of that interaction are relevant to the etiology of melanomas and the optimization of PDT to treat this type of skin neoplasia. Thus, we tested the role of  $^1\text{O}_2$  by employing the endoperoxide DHPNO<sub>2</sub> as a chemical source of  $^1\text{O}_2$ . DHPNO<sub>2</sub> undergoes a thermal decomposition into a naphthalene derivative at 37 °C in the dark; approximately 60% of the released dioxygen is in the excited form [76]. Interestingly, when DHPNO<sub>2</sub> was co-incubated with either type of melanin, DNA damage was reduced (Fig. 6A). A greater effect was observed for eumelanin: breakage decreased to 50% of OC + L in the presence of DHPNO<sub>2</sub>. Controls using preheated DHPNO<sub>2</sub> showed that DHPN can also play a role in this system (not shown). We believe that it contributes to the reduction of DNA strand breaks by acting as a  $^{\bullet}\text{OH}$  scavenger. Regardless, this result suggests an interaction between  $^1\text{O}_2$  and melanins. Recently, Chiarelli-Neto et al. [77] described that the photosensitization of melanins under visible light (532 nm) leads to  $^1\text{O}_2$  formation by a type II mechanism. It was proposed that melanins themselves suppress  $^1\text{O}_2$  by directly reacting with it. We employed this method to pretreat melanins with  $^1\text{O}_2$ . Melanins were irradiated with 526-nm-emitting LEDs before their incubation with DNA. Consistent with previous data,  $^1\text{O}_2$ -oxidized melanins were less able to induce DNA strand breaks (Fig. 6B) in a dose-dependent manner (Fig. 6C). Our results suggest that  $^1\text{O}_2$  somehow interferes with the action of melanins, reducing the effects caused by those pigments. To the best of our knowledge, this work is the first to report that  $^1\text{O}_2$  can contribute to the protection of DNA against damage from another agent.

In support of the idea that melanins react with  $^1\text{O}_2$ , melanins were found to bleach after DHPNO<sub>2</sub> treatment (Figs. 7A and B). Others have

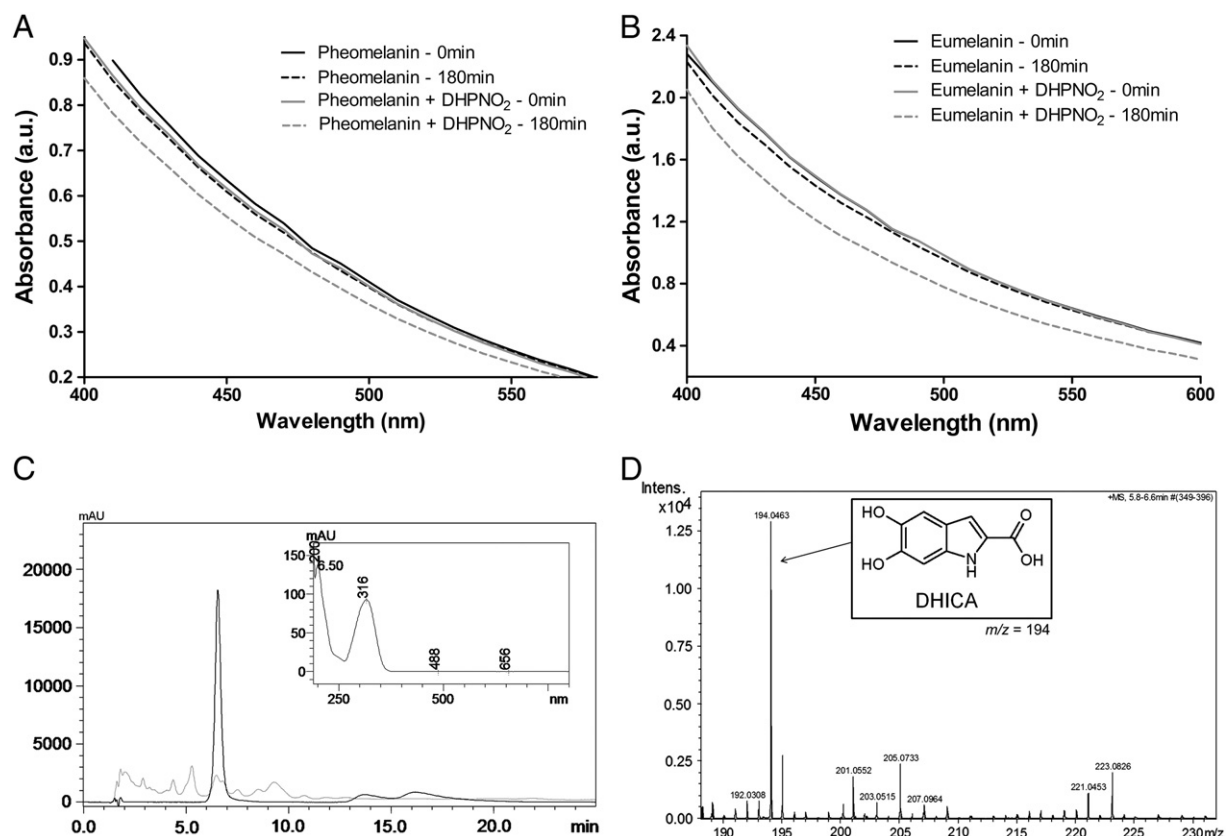


**Fig. 5.** Effect of melanins on the release of iron from ferritin as a function of incubation time. Iron release from horse spleen ferritin ( $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was monitored by measuring the increase in absorbance at 530 nm due to the formation of the  $\text{Fe}^{2+}$ –bathophenanthroline sulfonate complex when incubated in the presence of melanins ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). The data are shown as the means  $\pm$  SD of three independent experiments.



**Fig. 6.** The effect of singlet molecular oxygen on melanin-induced DNA breakage. (A) pUC18 plasmid (400 ng) was incubated under constant agitation with  $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  pheomelanin or eumelanin and 20 mM DHPNO<sub>2</sub> for 2.5 h at 37 °C, protected from the light. The results are expressed as the means of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , with Student's *t* test. (B) Melanins ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  in phosphate buffer, pH 7) were irradiated at  $526 \pm 20 \text{ nm}$  for a total dose of  $9 \text{ J/cm}^2$ . Then, the plasmid (400 ng) was added to the medium, and the reaction was carried out for 2.5 h at 37 °C, protected from the light. The results are expressed as the means of three independent experiments. \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ , after ANOVA followed by Tukey's test. (C) Melanins ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$  in phosphate buffer, pH 7) were irradiated at  $526 \pm 20 \text{ nm}$  for a total dose of 1.5 to  $9 \text{ J/cm}^2$ . Then, the plasmid (400 ng) was added to the medium, and the reaction was carried out for 2.5 h at 37 °C, protected from the light. The graph displays the ability of irradiated melanins to induce strand breaks relative to that of the nonirradiated melanins (in percentage). The data are shown as the means of an experiment performed in triplicate.

reported similar findings when melanins are photosensitized in the presence of Rose Bengal [78,79]. These effects could be correlated with changes to the structure of the melanin. To test this hypothesis,



**Fig. 7.** Evidence of a reaction between singlet oxygen reaction and melanins. A decrease in absorbance between 400 and 600 nm was observed when (A) pheomelanin or (B) eumelanin ( $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ , in phosphate buffer, pH 7) was incubated with 20 mM DHPNO<sub>2</sub> for 180 min. (C) Representative chromatogram of DHICA ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) before (black line) and after (gray line) incubation with 10 mM DHPNO<sub>2</sub>. The inset shows the UV-Vis spectrum for the DHICA peak achieved under the analysis conditions employed. (D) MS spectra of the peak of DHICA. The structure of DHICA is shown in the inset.

we employed the eumelanin precursor, DHICA, as a model (Fig. 7D, inset) because the amorphous property of melanins makes it difficult to analyze with conventional methods and a monomeric unit is easier to handle. We incubated DHICA with DHPNO<sub>2</sub>, and the products of the reaction were analyzed with HPLC. The peak of DHICA (retention time 6 min, confirmed with UV and MS; Figs. 7C, inset, and D, respectively) almost disappeared after DHPNO<sub>2</sub> incubation, indicating that the DHICA is consumed by <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Fig. 7C). We did not identify the products because our goal was only to confirm that DHICA was susceptible to oxidation by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Our results provide strong evidence that melanins react with <sup>1</sup>O<sub>2</sub> to generate other products (possibly more inert than melanin itself); thus, melanins act as potent scavengers of <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. It has already been suggested that <sup>1</sup>O<sub>2</sub> can add to the indol ring of melanin [77], but no biological significance has been attributed to this phenomenon. Others have also proposed that melanins can quench <sup>1</sup>O<sub>2</sub> [80]. Given our results, PDT may have a low efficacy not only because melanin absorbs light and therefore decreases the yield of excited dyes but also because the melanins in melanoma cells can function as effective <sup>1</sup>O<sub>2</sub> scavengers.

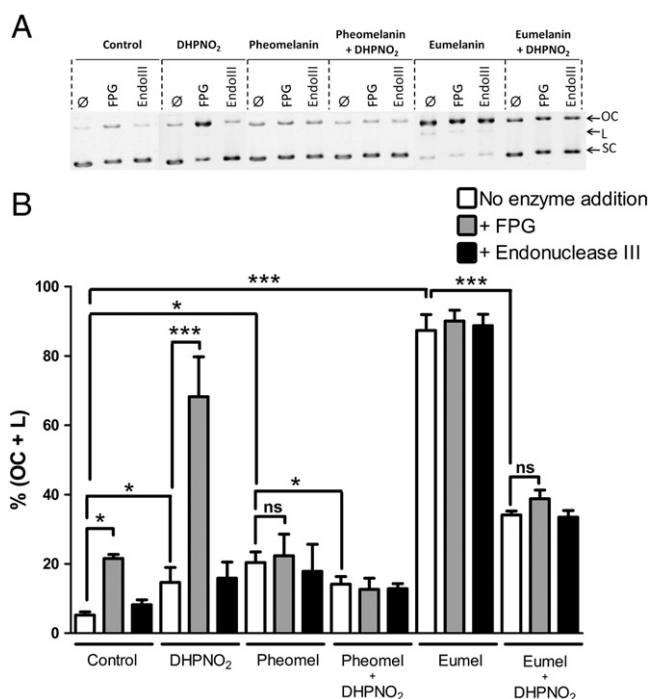
#### Recognition of melanin-mediated DNA lesions by repair enzymes

Once we demonstrated that melanins are able to damage DNA through a Fenton-type reaction and can also protect DNA from <sup>1</sup>O<sub>2</sub> oxidation, we attempted to check the yield of FPG- or EndoIII-sensitive sites in each case. Both enzymes participate in the repair of damaged DNA and catalyze a two-step reaction: first, the oxidized base is removed (*N*-glycosylase activity), generating an AP site; then, there is 3' and 5' cleavage in the AP site (AP-lyase activity), leading to the formation of a 1-base gap. The main difference between the two repair enzymes is that FPG can recognize oxidized bases, such as 8-oxo-7,8-dihydroadenine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine,

4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 5-hydroxycytosine, and 5-hydroxyuracil [81], whereas EndoIII (also abbreviated as Nth) has a higher specificity for other lesions, including urea, ThdGly, 5-hydroxy-5-methylhydantoin, 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrouracil (uracil glycol), and methyltartronylurea [82]. Thus, the recognition of the injured base by these enzymes increases the amount of nicked plasmid, which can be measured with agarose gel electrophoresis. Consistent with the literature, we found that <sup>1</sup>O<sub>2</sub> led to mild DNA breakage [39,83,84] and an increase in the amount of FPG- but not EndoIII-sensitive sites [34,85]. In the presence of melanins, neither FPG- nor EndoIII-mediated DNA cleavage was observed (Fig. 8).

Considering our findings, the very short half-life of <sup>•</sup>OH radicals (reaction constants for <sup>•</sup>OH/DNA,  $0.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [86]; <sup>•</sup>OH/pheomelanin,  $1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; <sup>•</sup>OH/eumelanin,  $1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [87]), and the structure of the melanins, we hypothesized that melanins could interact closely with DNA; in this way, they could prevent enzyme recognition of damaged bases. As the minor-groove binder Hoechst 33342 shares some structural similarity with melanins (it is also formed by indolic rings, see Fig. 9A), we tested whether melanins could compete for Hoechst binding sites by evaluating Hoechst fluorescence enhancement after DNA binding. If the two molecules compete for the same site, the addition of melanins to the Hoechst-bound DNA would result in a decrease in fluorescence. In fact, both pheomelanin and eumelanin were found to bind to the minor grooves of DNA (Figs. 9B and C). This property makes melanins very dangerous to DNA. If the excision of base lesions can be prevented by the binding of melanins, errors in replication would be perpetuated, resulting in the accumulation of genetic mutations and contributing to melanoma's genetic instability. In fact, it was shown that dysplastic nevus accumulates more FPG-sensitive sites on DNA than normal melanocytes [19] and that cells that are incubated in the presence of melanins have increased DNA





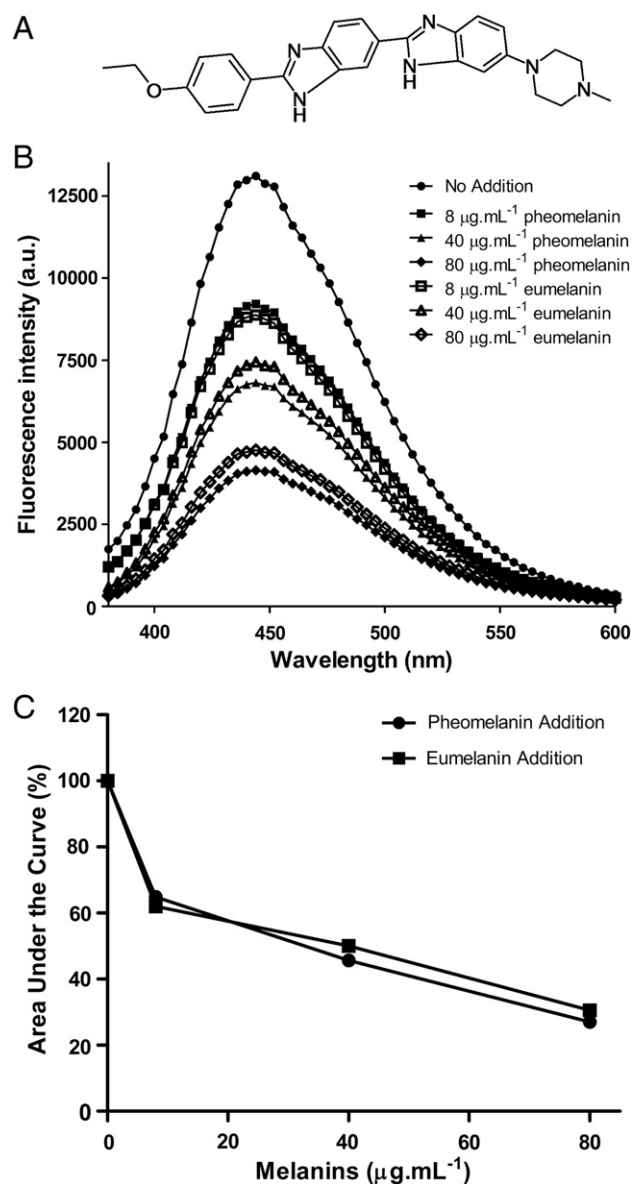
**Fig. 8.** DNA damage after treatment with DHPNO<sub>2</sub> and/or melanins and the recognition of damaged bases by the FPG or Endonuclease III repair enzyme. (A) Representative electrophoretic gel of pUC18 plasmid, and the effects of pheomelanin and eumelanin on <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced damage. ∅, no incubation with repair enzymes; OC, open circular form; L, linear form; SC, supercoiled form. (B) Percentage of open circular and linear DNA forms after incubation with 20 mM DHPNO<sub>2</sub> or pheomelanin/eumelanin (400 μg mL<sup>-1</sup>, in phosphate buffer, pH 7). Eumel, eumelanin; Pheomel, pheomelanin. The columns represent the means ± SD of three independent experiments. \**p* < 0.05; \*\*\**p* < 0.001; ns, not significant.

lesions due to oxidation [24]. This result could be due to either promotion of injury or lack of repair. Recently, Wang et al. [88] demonstrated that melanocytes are less effective in repairing DNA after UVA irradiation than normal fibroblasts; the authors proposed that an interaction of melanins with repair enzymes or DNA could be occurring, but a mechanism was not provided.

We next confirmed the ability of melanins to prevent the recognition of damaged bases. We incubated plasmids with DHPNO<sub>2</sub> to generate 8-oxodGuo; then, the FPG enzyme was added in the presence and absence of melanins. As a control, we used two known minor-groove binders, methyl green and Hoechst 33342. Because the presence of melanins could increase the amount of broken DNA, we used a shorter period of incubation in this experiment. We observed that the FPG activity on damaged DNA was lower when it was added together with the melanins (Fig. 10), suggesting that the FPG was not able to reach the damaged DNA and recognize the preformed lesions. This effect is probably due to melanin binding to the DNA and directly impairing the access of repair enzymes. Although we cannot rule out the possibility of a direct interaction between the melanins and the enzyme or a melanin-mediated loss of the enzyme's activity, our hypothesis is supported by the fact that melanin synthesis intermediates interact with DNA and impair deoxyribonuclease I activity [89]. This important and novel result highlights the harmful effect of melanins on DNA: not only do they have the potential to generate highly reactive ROS and lead to DNA backbone lesions, but they also prevent DNA repair.

## Conclusions

In this report, we show that both types of melanins, eumelanin and pheomelanin, can lead to DNA breakage, independently of an irradiation source. The probable mechanism is a Fenton-type reaction because melanins bind metal ions and have redox properties. We also clearly demonstrated that melanins associate with the minor

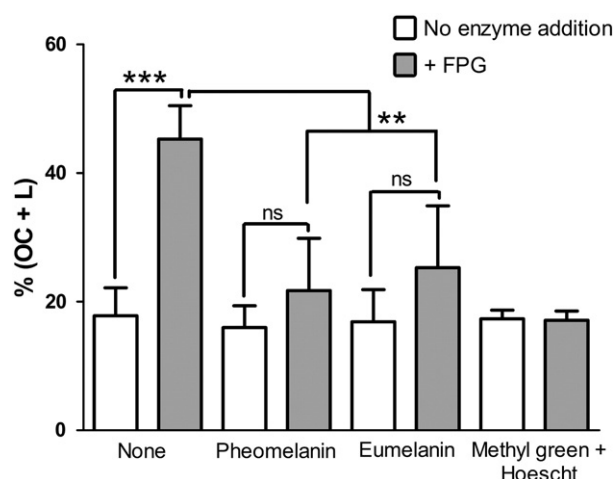


**Fig. 9.** Competition for the DNA minor groove by melanins and Hoechst 33342. (A) Molecular structure of Hoechst 33342 dye. (B) Hoechst 33342 was mixed with the plasmid, and the emission spectrum of the dye was obtained in the range of 370 to 600 nm upon excitation at 343 nm. The highest curve corresponds to the sample that received no melanin. As the melanins were added, a decrease in the fluorescence was observed. (C) The integration of the area under the curve of the data presented in (B) is shown to provide a better visualization of the effect of melanins on Hoechst binding to DNA.

grooves of DNA, allowing them to not only directly promote DNA damage but also prevent the access of repair enzymes to DNA lesions. Nevertheless, melanins react with <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, which may generate structural modifications that result in a reduced ability to break DNA. Our results support a dual role for melanins as pro- and antioxidants. Together with previous work, our results provide the basis for understanding the factors that contribute to the development of melanoma and may improve strategies for using PDT to treat melanoma, considering that DNA damage is an important factor contributing to cell death.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Prof. Dr. Joana Lea Meira Silveira, and Prof. Dr. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz for allowing us to use their laboratory. We are also grateful



**Fig. 10.** Lack of lesion recognition by FPG in the presence of melanins. Plasmids were incubated with 20 mM DHPNO<sub>2</sub> at 37 °C for 2.5 h and then subjected to FPG activity in the presence or absence of pheomelanin and eumelanin (400 µg ml<sup>-1</sup> in phosphate buffer, pH 7) at 37 °C for 30 min. Methyl green and Hoechst 33342 were used as controls. The results are expressed as the means ± SD of three independent experiments. \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; ns, not significant.

for Prof. Dr. Evaldo Ribeiro, who helped us with the LED validation, and for Cromatek, which kindly provided the LEDs. This work was sponsored by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Brasília, DF, Brazil), CAPES, CTINFRA/FINEP, Fundação Araucária, and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos REDOX em Biomedicina–Redoxoma.

## References

- [1] Prota, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.* **75**:122–127; 1980.
- [2] Klabunde, T.; Eicken, C.; Sacchetti, J. C.; Krebs, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* **5**:1084–1090; 1998.
- [3] Lerner, A. B.; Fitzpatrick, T. B.; Calkins, E.; Summerson, W. H. Mammalian tyrosinase: the relationship of copper to enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **187**:793–802; 1950.
- [4] Kertesz, D. Tyrosinase and polyphenoloxidase: the role of metallic ions in melanogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **9**:170–179; 1952.
- [5] Ezzahir, A. The influence of melanins on the photoperoxidation of lipids. *J. Photochem. Photobiol. B* **3**:341–349; 1989.
- [6] Potts, A. M.; Au, P. C. The affinity of melanin for inorganic ions. *Exp. Eye Res.* **22**:487–491; 1976.
- [7] Mars, U.; Larsson, B. S. Pheomelanin as a binding site for drugs and chemicals. *Pigment Cell Res.* **12**:266–274; 1999.
- [8] Krol, E. S.; Liebler, D. C. Photoprotective actions of natural and synthetic melanins. *Chem. Res. Toxicol.* **11**:1434–1440; 1998.
- [9] Rozanowska, M.; Sarna, T.; Land, E. J.; Truscott, T. G. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:518–525; 1999.
- [10] Herrling, T.; Jung, K.; Fuchs, J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **69**:1429–1435; 2008.
- [11] Chedekel, M. R.; Agin, P. P.; Sayre, R. M. Photochemistry of pheomelanin: action spectrum for superoxide production. *Photochem. Photobiol.* **31**:553–555; 1980.
- [12] Sarna, T.; Sealy, R. C. Photoinduced oxygen consumption in melanin systems: action spectra and quantum yields for eumelanin and synthetic melanin. *Photochem. Photobiol.* **39**:69–74; 1984.
- [13] Takeuchi, S. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical model of cell death in murine skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:15076–15081; 2004.
- [14] Bustamante, J.; Bredeson, L.; Malanga, G.; Mordoh, J. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res.* **6**:348–353; 1993.
- [15] Hoogdijjn, M. J.; Cemeli, E.; Ross, K.; Anderson, D.; Thody, A. J.; Wood, J. M. Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca<sup>2+</sup>. *Exp. Cell Res.* **294**:60–67; 2004.
- [16] Maresca, V.; Flori, E.; Briganti, S.; Mastrofrancesco, A.; Fabbri, C.; Mileo, A. M.; Paggi, M. G.; Picardo, M. Correlation between melanogenic and catalase activity in vitro human melanocytes: a synergic strategy against oxidative stress. *Pigment Cell Melanoma Res.* **21**:200–205; 2008.
- [17] Wang, A.; Marino, A. R.; Gasyna, Z.; Gasyna, E.; Norris, Jr., J. Photoprotection by porcine eumelanin against singlet oxygen production. *Photochem. Photobiol.* **84**:679–682; 2008.

- [18] Wenczl, E.; Van der Schans, G. P.; Roza, L.; Kolb, R. M.; Timmerman, A. J.; Smit, N. P.; Pavel, S.; Schothorst, A. A. (Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**:678–682; 1998.
- [19] Smit, N. P.; van Nieuwpoort, F. A.; Marrot, L.; Out, C.; Poorthuis, B.; van Pelt, H.; Meunier, J. R.; Pavel, S. Increased melanogenesis is a risk factor for oxidative DNA damage—study on cultured melanocytes and atypical nevus cells. *Photochem. Photobiol.* **84**:550–555; 2008.
- [20] Rhodes, A. R.; Seki, Y.; Fitzpatrick, T. B.; Stern, R. S. Melanosomal alterations in dysplastic melanocytic nevi: a quantitative, ultrastructural investigation. *Cancer* **61**:358–369; 1988.
- [21] Borovansky, J.; Mirejovsky, P.; Riley, P. A. Possible relationship between abnormal melanosome structure and cytotoxic phenomena in malignant melanoma. *Neoplasma* **38**:393–400; 1991.
- [22] Jimbow, K.; Lee, S. K.; King, M. G.; Hara, H.; Chen, H.; Dakour, J.; Marusyk, H. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **100**:259S–268S; 1993.
- [23] Kipp, C.; Young, A. R. The soluble eumelanin precursor 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid enhances oxidative damage in human keratinocyte DNA after UVA irradiation. *Photochem. Photobiol.* **70**:191–198; 1999.
- [24] Hill, H. Z.; Hill, G. J. Eumelanin causes DNA strand breaks and kills cells. *Pigment Cell Res.* **1**:163–170; 1987.
- [25] Berwick, M.; Erdei, E.; Hay, J. Melanoma epidemiology and public health. *Dermatol. Clin.* **27**:205–214; 2009.
- [26] Moan, J.; Dahlback, A.; Setlow, R. B. Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* **70**:243–247; 1999.
- [27] Coelho, S. G.; Hearing, V. J. UVA tanning is involved in the increased incidence of skin cancers in fair-skinned young women. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**:57–63; 2010.
- [28] Rytter, S. W.; Tyrrell, R. M. Singlet molecular oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **24**:1520–1534; 1998.
- [29] Baier, J.; Maisch, T.; Maier, M.; Landthaler, M.; Bäuml, W. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J. Invest. Dermatol.* **127**:1498–1506; 2007.
- [30] Wright, A.; Bubb, W. A.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J. Singlet oxygen-mediated protein oxidation: evidence for the formation of reactive side chain peroxides on tyrosine residues. *Photochem. Photobiol.* **76**:35–46; 2002.
- [31] Davies, M. J. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem. Photobiol. Sci.* **3**:17–25; 2004.
- [32] Baier, J. R.; Maisch, T.; Regensburger, J.; Pollmann, C.; Bäuml, W. Optical detection of singlet oxygen produced by fatty acids and phospholipids under ultraviolet A irradiation. *J. Biomed. Opt.* **13**:044029; 2008.
- [33] Ravanat, J. L.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H.; Cadet, J. Singlet oxygen induces oxidation of cellular DNA. *J. Biol. Chem.* **275**:40601–40604; 2000.
- [34] Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S.; Caillat, S.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H.; Di Mascio, P.; Favier, A.; Cadet, J. Singlet oxygen-mediated damage to cellular DNA determined by the comet assay associated with DNA repair enzymes. *Biol. Chem.* **385**:17–20; 2004.
- [35] Ravanat, J. L.; Saint-Pierre, C.; Di Mascio, P.; Martinez, G. R.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J. Damage to isolated DNA mediated by singlet oxygen. *Helv. Chim. Acta* **84**:3702–3709; 2001.
- [36] Michaels, M. L.; Tchou, J.; Grollman, A. P.; Miller, J. H. A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* **31**:10964–10968; 1992.
- [37] Maki, H.; Sekiguchi, M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**:273–275; 1992.
- [38] Fiel, R. J.; Datta-Gupta, N.; Mark, E. H.; Howard, J. C. Induction of DNA damage by porphyrin photosensitizers. *Cancer Res.* **41**:3543–3545; 1981.
- [39] Di Mascio, P.; Wefers, H.; Do-Thi, H. P.; Lafleur, M. V.; Sies, H. Singlet molecular oxygen causes loss of biological activity in plasmid and bacteriophage DNA and induces single-strand breaks. *Biochim. Biophys. Acta* **1007**:151–157; 1989.
- [40] Epe, B.; Hegler, J.; Wild, D. Singlet oxygen as an ultimately reactive species in Salmonella typhimurium DNA damage induced by methylene blue/visible light. *Carcinogenesis* **10**:2019–2024; 1989.
- [41] Devasagayam, T. P.; Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Singlet oxygen induced single-strand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**:409–412; 1991.
- [42] Martinez, G. R.; Ravanat, J. L.; Medeiros, M. H. G.; Cadet, J.; Di Mascio, P. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of <sup>18</sup>O-labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.* **122**:10212–10213; 2000.
- [43] Martinez, G. R.; Ravanat, J. L.; Cadet, J.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H.; Di Mascio, P. Energy transfer between singlet (<sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) and triplet (<sup>3</sup>Σ<sub>g</sub><sup>-</sup>) molecular oxygen in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **126**:3056–3057; 2004.
- [44] Ito, S. Optimization of conditions for preparing synthetic pheomelanin. *Pigment Cell Res.* **2**:53–56; 1989.
- [45] Kolb, A. M.; Lentjes, E. G.; Smit, N. P.; Schothorst, A.; Vermeer, B. J.; Pavel, S. Determination of pheomelanin by measurement of aminohydroxyphenylalanine isomers with high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **252**:293–298; 1997.
- [46] Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P. Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods Enzymol.* **319**:3–20; 2000.
- [47] Epe, B.; Hegler, J. Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.* **234**:122–131; 1994.
- [48] Frelon, S.; Douki, T.; Ravanat, J. L.; Pouget, J. P.; Tornabene, C.; Cadet, J. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:1002–1010; 2000.

- [49] Oteiza, P. I.; Kleinman, C. G.; Demasi, M.; Bechara, E. J. 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**:607–611; 1995.
- [50] Charkoudian, L. K.; Franz, K. J. Fe(III)-coordination properties of neuromelanin components: 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Inorg. Chem.* **45**:3657–3664; 2006.
- [51] Heikkilä, R. E.; Cohen, G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science* **181**:456–457; 1973.
- [52] Korytowski, W.; Hintz, P.; Sealy, R. C.; Kalyanaraman, B. Mechanism of dismutation of superoxide produced during autooxidation of melanin pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**:659–665; 1985.
- [53] Nappi, A. J.; Vass, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanin precursors 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Melanoma Res.* **6**:341–349; 1996.
- [54] Kennedy, L. J.; Moore Jr., K.; Caulfield, J. L.; Tannenbaum, S. R.; Dedon, P. C. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem. Res. Toxicol.* **10**:386–392; 1997.
- [55] Lloyd, D. R.; Carmichael, P. L.; Phillips, D. H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions. *Chem. Res. Toxicol.* **11**:420–427; 1998.
- [56] Frelon, S.; Douki, T.; Favier, A.; Cadet, J. Comparative study of base damage induced by  $\gamma$  radiation and Fenton reaction in isolated DNA. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. (1)*:2866–2870; 2002.
- [57] Cadet, J.; Berger, M.; Decarroz, C.; Wagner, J. R.; van Lier, J. E.; Ginot, Y. M.; Vigny, P. Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie* **68**:813–834; 1986.
- [58] Frelon, S.; Douki, T.; Favier, A.; Cadet, J. Hydroxyl radical is not the main reactive species involved in the degradation of DNA bases by copper in the presence of hydrogen peroxide. *Chem. Res. Toxicol.* **16**:191–197; 2003.
- [59] Yamamoto, K.; Inoue, S.; Yamazaki, A.; Yoshinaga, T.; Kawanishi, S. Site-specific DNA damage induced by cobalt(II) ion and hydrogen peroxide: role of singlet oxygen. *Chem. Res. Toxicol.* **2**:234–239; 1989.
- [60] Ma, W. J.; Cao, E. H.; Qin, J. F. The involvement of singlet oxygen in copper-phenanthroline/ $H_2O_2$ -induced DNA base damage: a chemiluminescent study. *Redox Rep.* **4**:271–276; 1999.
- [61] Li, Y.; Trush, M. A. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* **14**:1303–1311; 1993.
- [62] Sheu, C.; Foote, C. S. Reactivity toward singlet oxygen of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine ("8-hydroxyguanosine") formed by photooxidation of a guanosine derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **117**:6439–6442; 1995.
- [63] Duarte, V.; Gasparutto, D.; Jaquinod, M.; Ravanat, J.; Cadet, J. Repair and mutagenic potential of oxaluric acid, a major product of singlet oxygen-mediated oxidation of 8-oxo-7,8-dihydroguanine. *Chem. Res. Toxicol.* **14**:46–53; 2001.
- [64] Tretyakova, N. Y.; Wishnok, J. S.; Tannenbaum, S. R. Peroxynitrite-induced secondary oxidative lesions at guanine nucleobases: chemical stability and recognition by the Fpg DNA repair enzyme. *Chem. Res. Toxicol.* **13**:658–664; 2000.
- [65] Theruvathu, J. A.; Jaruga, P.; Dizdaroğlu, M.; Brooks, P. J. The oxidatively induced DNA lesions 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine and 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine are strongly resistant to acid-induced hydrolysis of the glycosidic bond. *Mech. Ageing Dev.* **128**:494–502; 2007.
- [66] Cadet, J.; Douki, T.; Ravanat, J. -L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **49**:9–21; 2010.
- [67] Dunford, R.; Land, E. J.; Rozanowska, M.; Brooks, P. J. Interaction of melanin with carbon- and oxygen-centered radicals from methanol and ethanol. *Free Radic. Biol. Med.* **19**:735–740; 1995.
- [68] Ries, J.; Sarna, T.; Meredith, P. Radiative relaxation in synthetic pheomelanin. *J. Phys. Chem. B* **110**:13985–13990; 2006.
- [69] Miller, D. M.; Buettner, G. R.; Aust, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **8**:95–108; 1990.
- [70] Riley, P. A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:1235–1239; 1997.
- [71] Hong, L.; Simon, J. D. Current understanding of the binding sites, capacity, affinity, and biological significance of metals in melanin. *J. Phys. Chem. B* **111**:7938–7947; 2007.
- [72] Bedrick, A. E.; Ramaswamy, G.; Tchertkoff, V. Histochemical determination of copper, zinc, and iron in some benign and malignant tissues. *Am. J. Clin. Pathol.* **86**:637–640; 1986.
- [73] Sealy, R. C. Radicals in melanin biochemistry. *Methods Enzymol.* **105**:479–483; 1984.
- [74] Baldi, A.; Battista, T.; De Luca, A.; Santini, D.; Rossiello, L.; Baldi, F.; Natali, P. G.; Lombardi, D.; Picardo, M.; Felsani, A.; Paggi, M. G. Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study. *Exp. Dermatol.* **12**:213–218; 2003.
- [75] Baldi, A. Ferritin contributes to melanoma progression by modulating cell growth and sensitivity to oxidative stress. *Clin. Cancer Res.* **11**:3175–3183; 2005.
- [76] Dewilde, A.; Pellieux, C.; Pierlot, C.; Wattre, P.; Aubry, J. M. Inactivation of intracellular and non-enveloped viruses by a non-ionic naphthalene endoperoxide. *Biol. Chem.* **379**:1377–1379; 1998.
- [77] Chiarelli-Neto, O.; Pavani, C.; Ferreira, A. S.; Uchoa, A. F.; Severino, D.; Baptista, M. S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radic. Biol. Med.* **51**:1195–1202; 2011.
- [78] Sealy, R. C.; Sarna, T.; Wanner, E. J.; Reszka, K. Photosensitization of melanin: an electron spin resonance study of sensitized radical production and oxygen consumption. *Photochem. Photobiol.* **40**:453–459; 1984.
- [79] Sarna, T.; Menon, I. A.; Sealy, R. C. Photosensitization of melanins: a comparative study. *Photochem. Photobiol.* **42**:529–532; 1985.
- [80] Tada, M.; Kohno, M.; Niwano, Y. Scavenging or quenching effect of melanin on superoxide anion and singlet oxygen. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **46**:224–228; 2010.
- [81] Tchou, J.; Bodepudi, V.; Shibutani, S.; Antoshechkin, I.; Miller, J.; Grollman, A. P.; Johnson, F. Substrate specificity of Fpg protein: recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J. Biol. Chem.* **269**:15318–15324; 1994.
- [82] Hatahet, Z.; Kow, Y. W.; Purmal, A. A.; Cunningham, R. P.; Wallace, S. S. New substrates for old enzymes: 5-hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *J. Biol. Chem.* **269**:18814–18820; 1994.
- [83] Khan, A. U.; Mei, Y. H.; Wilson, T. A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:11426–11427; 1992.
- [84] Devasagayam, T. P.; Steenken, S.; Obendorf, M. S.; Schulz, W. A.; Sies, H. Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* **30**:6283–6289; 1991.
- [85] Schulz, I.; Mahler, H. C.; Boiteux, S.; Epe, B. Oxidative DNA base damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonucleases and mutagenicity. *Mutat. Res.* **461**:145–156; 2000.
- [86] Michaels, H. B.; Hunt, J. W. Reactions of the hydroxyl radical with polynucleotides. *Radiat. Res.* **56**:57–70; 1973.
- [87] Sarna, T.; Pilas, B.; Land, E. J.; Truscott, T. G. Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim. Biophys. Acta* **883**:162–167; 1986.
- [88] Wang, H. T.; Choi, B.; Tang, M. S. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photoproducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:12180–12185; 2010.
- [89] Miranda, M.; Botti, D.; Di Cola, M. Possible genotoxicity of melanin synthesis intermediates: tyrosinase reaction products interact with DNA in vitro. *Mol. Gen. Genet.* **193**:395–399; 1984.